

# Anticuerpos antirreceptores $\beta$ -adrenérgicos en la enfermedad de Chagas crónica

PABLO A. CHIALE, ESTELA A. FEIGELSON, MARIANO LEVIN, MARCELO V. ELIZARI, JOHAN HOEBEKE, MAURICIO B. ROSENBAUM

Departamento de Cardiología, Hospital Ramos Mejía, Buenos Aires

Dirección para separatas: Departamento de Cardiología, Hospital Ramos Mejía, Urquiza 609, Buenos Aires, Argentina

Estudios recientes han demostrado anticuerpos antirreceptores beta-adrenérgicos en un tercio de pacientes con cardiomiopatía dilatada idiopática. Los anticuerpos antirreceptores beta-adrenérgicos pueden ejercer efectos estimulantes e inhibidores a través de los cuales podrían intervenir en la patogenia de la enfermedad miocárdica. En 1976, Sterin-Borda y colaboradores demostraron en forma indirecta que el suero y la IgG de pacientes con enfermedad de Chagas podían contener anticuerpos antirreceptores beta-adrenérgicos. Sin embargo, no evaluaron ni la prevalencia de los anticuerpos antirreceptores beta-adrenérgicos ni su relación con las diversas formas clínicas de la cardiomiopatía chagásica crónica. Con el propósito de determinar la prevalencia de anticuerpos antirreceptores beta-adrenérgicos en la enfermedad de Chagas se estudiaron los sueros de 48 pacientes chagásicos (8 con cardiomiopatía chagásica crónica severa, 16 con cardiomiopatía chagásica crónica "eléctrica" y 24 sin cardiopatía aparente) y de 67 controles (55 individuos sanos y 12 cardiopatías sin enfermedad de Chagas ni cardiopatía dilatada idiopática). La presencia de anticuerpos antirreceptores beta-adrenérgicos fue determinada por ELISA utilizándose péptidos sintéticos derivados de la secuencia de aminoácidos de los receptores 1 (aminoácidos 183 a 208) y 2 (aminoácidos 172 a 197). Fueron considerados positivos los sueros cuyas densidades ópticas excedieron en  $\geq 2DS$  el promedio de las densidades ópticas de los controles. Cincuenta y uno (76%) de los sueros del grupo control no reconocieron ninguno de los dos péptidos; 16 (23,9%) tuvieron anticuerpos antirreceptores beta-adrenérgicos, dirigidos contra el péptido 1 (17,9%) y/o 2 (11,9%). En contraste, sólo 22 (45,8%) de los sueros chagásicos carecieron de anticuerpos antirreceptores beta-adrenérgicos, mientras 23 (47,9%) tuvieron anticuerpos antirreceptores beta-adrenérgicos dirigidos contra el péptido 1 ( $p \leq 0,003$ ) y 16 (33,3%) contra el péptido 2 ( $p \leq 0,003$ ). No hubo diferencias significativas, en cambio, entre los sueros de pacientes con cardiomiopatía chagásica crónica severa o "eléctrica" y sin cardiopatía aparente. Los resultados de este estudio muestran una elevada prevalencia de anticuerpos antirreceptores beta-adrenérgicos, sobre todo para anti 1, pero también anti 2, en la enfermedad de Chagas crónica. Se ignora en cuántos pacientes los anticuerpos antirreceptores beta-adrenérgicos desarrollan actividad funcional, hecho esencial para establecer su eventual participación en la patogenia de la cardiomiopatía chagásica crónica. El reconocimiento de la alta prevalencia de anticuerpos antirreceptores beta-adrenérgicos abre nuevas perspectivas para el diagnóstico y tratamiento de la cardiomiopatía chagásica crónica. *Rev Arg Cardiol* 1994; 62 (1): 31-38.

*Palabras clave* Anticuerpos - Enfermedad de Chagas - Inmunoglobulinas

Las cardiomiopatías chagásicas crónica y dilatada idiopática comparten una variedad de anticuerpos análogos, que reaccionan con diversas estructuras cardíacas y sugieren un vínculo inmunológico entre las dos enfermedades.<sup>1-4</sup> Los tejidos blanco comunes para estos anticuerpos incluyen el sarcolema,<sup>1, 5, 6</sup> la miosina,<sup>3, 5, 7</sup> la actina,<sup>2, 3</sup> la laminina<sup>8-10</sup> y la tubulina.<sup>2, 3</sup> Sin embargo, el valor diagnóstico y pronóstico de estos anticuerpos es limitado, su

participación en la patogenia de esas enfermedades parece poco probable y no han sido identificados los determinantes antigénicos a nivel molecular.

En estudios recientes se describieron anticuerpos que pueden tener importancia diagnóstica y pronóstica, como los dirigidos contra el péptido sintético R-13 del *Trypanosoma cruzi* y la proteína P ribosómica humana en la enfermedad de Chagas,<sup>11, 12</sup> los anticuerpos contra

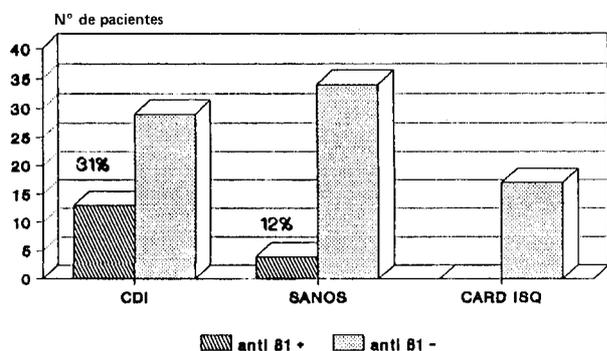


Fig. 1. Prevalencia de anticuerpos anti-receptores  $\beta 1$  en la cardiomiopatía dilatada idiopática (CDI) en comparación con la cardiopatía isquémica (Card. isq.) y una población de individuos sanos. (Modificado de Magnusson y colaboradores<sup>17</sup>.)

la proteína transportadora del ADP/ATP de la membrana interna de las mitocondrias en la cardiomiopatía dilatada idiopática<sup>13, 14</sup> y los anticuerpos anti-receptores  $\beta$ -adrenérgicos en ambas enfermedades.<sup>15, 16</sup> Estos dos últimos anticuerpos desarrollan una actividad funcional que es capaz de producir disfunción y aun lesión de las fibras miocárdicas y en consecuencia podrían desempeñar un papel importante en la patogenia de la agresión miocárdica crónica.

En 1990, Magnusson y colaboradores<sup>17</sup> demostraron que una tercera parte de los sueros de pacientes con cardiomiopatía dilatada idiopática presenta anticuerpos contra un péptido derivado de la secuencia de aminoácidos contenidos en la segunda asa extracelular del receptor  $\beta 1$  y que estos anticuerpos están ausentes en pacientes con cardiopatía isquémica y aparecen sólo en el 12% de los individuos sanos (fig. 1). En cambio, no encontraron diferencias en la prevalencia de anticuerpos dirigidos contra un epítipo similar del receptor  $\beta 2$  adrenérgico.

En 1976, Sterin-Borda y colaboradores<sup>15, 18, 19</sup> describieron la presencia de anticuerpos anti-receptores  $\beta 1$  y  $\beta 2$  en el suero y la IgG de pacientes con enfermedad de Chagas. Estos investigadores analizaron básicamente los efectos cronotrópicos e inotrópicos de los sueros y la IgG en preparados aislados de aurícula de rata, pero no definieron ni la prevalencia ni la relación de los anticuerpos anti-receptores  $\beta$  con las diferentes formas clínicas de la enfermedad de Chagas y tampoco identificaron los determinantes antigénicos a nivel molecular y su posible relación con la infección tripanosómica.

El objetivo de este estudio fue evaluar la prevalencia de anticuerpos anti-receptores  $\beta 1$  y  $\beta 2$  en la enfermedad de Chagas crónica en com-

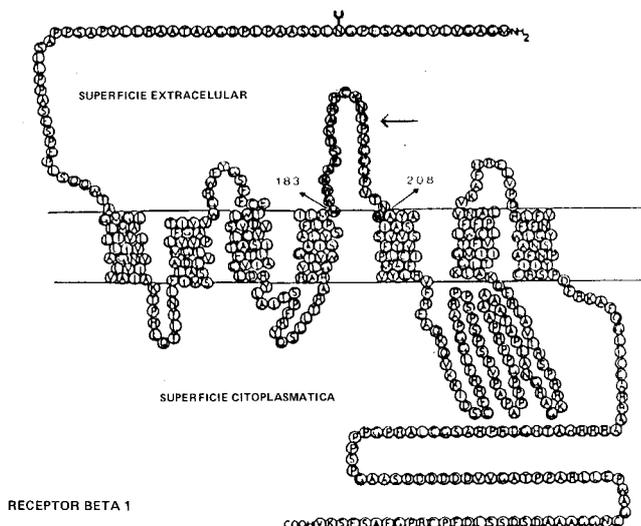


Fig. 2. Estructura molecular del receptor  $\beta 1$  humano que muestra el péptido (flecha superior) utilizado para detectar anticuerpos anti-receptor  $\beta 1$ .

paración con un grupo control integrado por individuos sanos y con cardiopatías no chagásica ni dilatada idiopática, y correlacionar la presencia de esos anticuerpos con diferentes formas clínicas de la enfermedad.

## MATERIAL Y METODO

### 1. Grupo control

Como controles se utilizaron los sueros de 55 individuos sanos, dadores de sangre, con serología negativa para la enfermedad de Chagas, y de 12 pacientes no chagásicos con cardiopatías diversas (cardiopatía isquémica, 5 pacientes; cardiomiopatía hipertrófica, 4; valvulopatías, 2; cardiopatía hipertensiva, 1).

### 2. Grupo chagásico

Se incluyeron 48 pacientes con infección chagásica crónica. Sobre la base de los hallazgos electrocardiográficos, ecocardiográficos, en el ventriculograma radioisotópico y el ECG ambulatorio de 24 horas con sistema Holter, se obtuvieron tres grupos:

**Grupo 1** (n: 8). Cardiomiopatía chagásica avanzada o grave: fracción de eyección  $\leq 40\%$  y/o anomalías definidas de la motilidad parietal y/o aneurisma apical.

**Grupo 2** (n: 16). Cardiomiopatía chagásica con compromiso predominante o exclusivo del sistema de conducción y/o arritmias: fracción de eyección  $> 40\%$  sin anomalías de la motilidad parietal y con alteraciones electrocardiográficas tales como bloqueos intraventricu-

**Tabla 1**  
Prevalencia de anticuerpos antirreceptores  $\beta$  en la enfermedad de Chagas (ECh) y en el grupo control

	Anticuerpos				Total
	Anti $\beta 1^+$	Anti $\beta 2^+$	Anti $\beta 1^+ + \beta 2^+$	Anti $\beta^-$	
Control	8 (11,9%)	4 (6%)	4 (6%)	51 (76,1%)	67 (100%)
ECh	10 (20,8%)	3 (6,3%)	13 (27%)	22 (45,8%)	48 (100%)

lares, bloqueos AV de segundo o tercer grado, disfunción sinusal, arritmias auriculares (extrasístoles auriculares frecuentes, fibrilación auricular o aleteo auricular) y/o ventriculares (extrasístoles ventriculares frecuentes, multiformes y/o con formas repetitivas).

**Grupo 3** (n: 24). Estadio preclínico: fracción de eyección > 50%, sin anomalías definidas de la motilidad parietal y ECG normal.

Una vez finalizada la evaluación clínica, se tomaron muestras de sangre en ayunas, que fueron codificadas y enviadas al laboratorio para determinar la presencia de anticuerpos antirreceptores  $\beta 1$  y  $\beta 2$  mediante inmunoensayo enzimático, como se describe a continuación. Se adsorbieron 50  $\mu$ l de una solución suplementada con 1% (vol/vol) de  $\beta$ -mercaptoetanol conteniendo 50  $\mu$ l/ml de péptido durante 1 hora a temperatura ambiente en platos NUNC (Kanstrup, Denmark). Los péptidos fueron sintetizados por el método de fase sólida de Merrifield<sup>20</sup> utilizando un sintetizador automático (modelo N° 430 A: Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA) y luego desalinizados y almacenados a -20°C hasta el momento de su uso. La composición de los péptidos purificados fue verificada en un analizador automático de aminoácidos (Beckman Instruments, Inc.; Palo Alto, CA). Los péptidos corresponden a la secuencia de aminoácidos de la segunda asa extracelular de los receptores  $\beta$  humanos (figura 2). El péptido  $\beta 1$  contiene los aminoácidos 183 a 208 (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  $\beta 2$  los aminoácidos 172 a 197 (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). Ambos péptidos contienen un grupo cisteína como carboxilo terminal. A la solución que contenía los péptidos se le agregó 50  $\mu$ l de las diluciones de los sueros 1:20 a 1:160 y se los mantuvo durante una noche a 4°C. Luego se adicionó una solución de anticuerpos de conejo anti-IgG humana diluida al

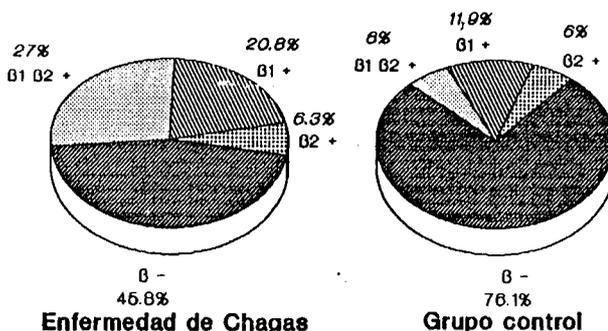


Fig. 3. Prevalencia de anticuerpos antirreceptores  $\beta$  en la enfermedad de Chagas crónica; 54% de los sueros chagásicos reconocieron los péptidos  $\beta 1$  y/o  $\beta 2$ ; sólo 24% de los sueros controles reaccionaron contra uno o ambos péptidos  $\beta$ .

1:1.000. Una hora después se efectuaron tres lavados y los anticuerpos unidos fueron detectados por incubación de las placas durante 1 hora a temperatura ambiente con una solución de estreptavidina-peroxidasa (1  $\mu$ /ml). Luego de tres lavados más, se agregó el sustrato cromogénico H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2,5 mM)-2,2'-azino-di-(etil-benzotiazoline) ácido sulfónico (2 mM) (ABTS, Sigma Chemical Co.). Las densidades ópticas (DO) fueron leídas 30 minutos después a 405 nm en un lector TITERTEK-ELISA (Flow Laboratories, Irvine, Scotland). Para el análisis de los resultados fueron considerados positivos los sueros cuyas DO excedieran en más de 2 desvíos estándar el promedio de las DO de los controles. Todas las lecturas, excepto las de los controles sanos, fueron realizadas sin que el operador conociera los diagnósticos correspondientes.

**Análisis estadístico**

La positividad de los sueros de los pacientes chagásicos y de los controles fue comparada mediante la prueba de chi cuadrado para datos no paramétricos, considerándose al valor de  $p < 0,05$  como de significación estadística.

**Resultados**

La tabla 1 y la figura 3 resumen los resultados. Cincuenta y uno (76,1%) de los sueros del grupo control no reconocieron ninguno de los dos péptidos; 16 (23,9%) tuvieron anticuerpos antirreceptores  $\beta$  dirigidos contra el péptido  $\beta 1$  (17,9%) y/o  $\beta 2$  (11,9%). En contraste, sólo 22 (45,8%) de los sueros chagásicos carecieron de anticuerpos antirreceptores  $\beta$ , mientras 26 (54,2%) reconocieron uno o ambos péptidos  $\beta$ , 23 (47,9%) el péptido  $\beta 1$  ( $p < 0,003$ ) y 16 (33,3%) el péptido  $\beta 2$  ( $p < 0,003$ ).

**Tabla 2**  
Prevalencia de anticuerpos antirreceptores  $\beta 1$  y  $\beta 2$  en diferentes formas clínicas de la enfermedad de Chagas

	Anticuerpos			Total
	Anti $\beta 1^+$	Anti $\beta 2^+$	Anti $\beta^-$	
Grupo I	2 (25 %)	2 (25 %)	4 (50 %)	8 (100%)
Grupo II	5 (31,3%)	1 ( 6,2%)	10 (62,5%)	16 (100%)
Grupo III	13 (54,2%)	3 (12,5%)	8 (33,3%)	24 (100%)

La tabla 2 y la figura 4 describen la prevalencia de anticuerpos antirreceptores  $\beta 1$  y  $\beta 2$  en diferentes formas clínicas de la enfermedad de Chagas.

Los porcentajes de positividad en los sueros de los pacientes chagásicos con cardiomiopatía grave o "eléctrica" y sin cardiopatía aparente no presentaron diferencias con significación estadística, sugiriendo que no existiría correlación entre la magnitud del compromiso miocárdico y la presencia de estos anticuerpos. Sin embargo, los porcentajes fueron mayores en el grupo 3 que en el grupo 1 y más altos en éste que en el 2, hecho paradójico que será analizado en la discusión.

#### DISCUSION

Los resultados de este estudio revelan una prevalencia elevada de anticuerpos antirreceptores  $\beta 1$  y  $\beta 2$  en la enfermedad de Chagas crónica y que esa prevalencia es significativamente mayor que en individuos sanos o con cardiopatías no chagásicas. Por otra parte, cuando se comparan estos resultados con los descriptos por Magnusson y colaboradores en la cardiomiopatía dilatada idiopática (31% de positividad)<sup>17</sup> y con observaciones inéditas de nuestro grupo en pacientes con cardiopatía "eléctrica" primaria (39,5% de positividad), la prevalencia también es significativamente mayor en la enfermedad de Chagas. A pesar de las diferencias cuantitativas, el hallazgo de anticuerpos antirreceptores  $\beta$  en estas patologías sugeriría un nexo patogénico en el que los anticuerpos podrían intervenir a través de sus peculiares propiedades funcionales.

#### Propiedades funcionales de los anticuerpos antirreceptores $\beta$

En condiciones experimentales, los anticuerpos antirreceptores  $\beta$  desarrollan efectos estimulantes adrenérgicos. Sterin-Borda y colaboradores fueron los primeros en mostrar que

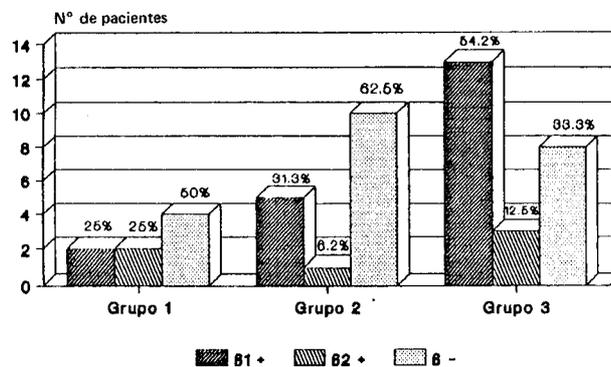


Fig. 4. Prevalencia de anticuerpos antirreceptores  $\beta$  en las diferentes formas clínicas de la enfermedad de Chagas. Aunque sin significación estadística, la prevalencia de anticuerpos antirreceptores  $\beta$  fue mayor en los pacientes sin compromiso cardíaco aparente.

el suero y la IgG de pacientes con enfermedad de Chagas producen efectos cronotrópicos e inotrópicos positivos en preparados de aurícula de rata,<sup>18, 19</sup> que la actividad de la adenilato-ciclasa aumenta de manera proporcional a la concentración de IgG chagásica<sup>21</sup> y que los niveles intracelulares de AMPc se elevan tal como lo hacen en respuesta al isoproterenol<sup>15</sup> (fig. 5).

En cultivos de miocitos de ratas recién nacidas, los anticuerpos antirreceptores  $\beta 1$  purificados de pacientes con cardiomiopatía dilatada idiopática<sup>22</sup> y de conejos inmunizados con el péptido  $\beta 1$ <sup>16, 22</sup> producen un rápido aumento de la frecuencia. Este efecto, que es dosis-dependiente, puede ser antagonizado por un bloqueante  $\beta 1$  selectivo (bisoprolol), pero no por un bloqueante  $\beta 2$  selectivo (ICI 118.151) y es inhibido por preincubación de los anticuerpos con el péptido  $\beta 1$  (fig. 6).

En conjunto, estas observaciones sugieren que los anticuerpos dirigidos contra los receptores  $\beta$  cumplen con los criterios para ser admitidos en la familia de los agonistas o símil agonistas  $\beta$  adrenérgicos. Sin embargo, existen diferencias entre el efecto estimulante  $\beta$  adrenérgico inducido por los agonistas neurohormonales y el producido por los anticuerpos antirreceptores  $\beta$ . Magnusson y colaboradores<sup>22</sup> demostraron que el efecto cronotrópico mediado por los anticuerpos antirreceptores  $\beta$ , a diferencia del inducido por el isoproterenol, persiste durante un período de 6 horas. Este efecto estimulante sostenido fue confirmado en otro modelo experimental<sup>23</sup> en el que la acción cronotrópica del suero y la IgG de pacientes con miocardiopatía dilatada idiopática se mantuvo inalterada

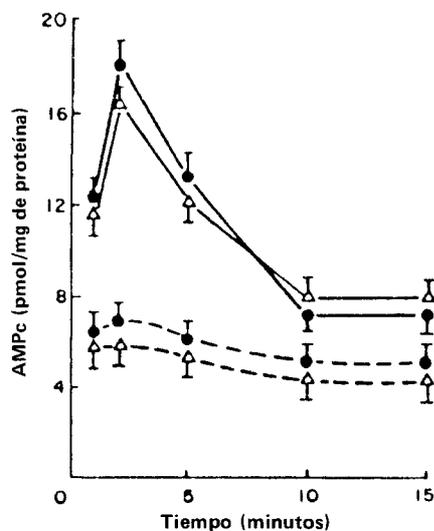


Fig. 5. Efecto de la IgG (●-●) chagásica y del F(ab)'2 (Δ-Δ) sobre la concentración de AMPc en homogenados de células cardíacas. Los valores son el resultado del promedio de cinco experimentos. La preincubación de los tejidos con propranolol (10<sup>-7</sup> M) previene el aumento del AMPc inducido por la IgG (●-●) y F(ab)'2 (Δ-Δ) chagásicas. (Reproducido de Sterin-Borda y colaboradores<sup>15</sup>.)

durante 24 horas y no pudo ser inhibida por lavado y reincubación en un medio de cultivo fresco (fig. 7). Estas observaciones sugieren que el cambio conformacional del receptor  $\beta$  inducido por los anticuerpos antirreceptores  $\beta$  no gatilla el proceso de desensibilización que normalmente inducen los agonistas neurohormonales, lo que explicaría su persistente efecto estimulante.

### Importancia patogénica potencial de los anticuerpos antirreceptores $\beta$

Si tanto en la cardiomiopatía dilatada idiopática como en la cardiomiopatía chagásica existe un aumento de la activación adrenérgica mediada por anticuerpos, ello podría generar efectos cardiotóxicos similares a los que producen las catecolaminas.<sup>24, 25</sup> Los pacientes con feocromocitoma tienen un espectro muy amplio de anomalías cardíacas que van desde un cuadro similar al del infarto agudo de miocardio<sup>24</sup> hasta el de una cardiomiopatía dilatada crónica.<sup>24, 26, 27</sup> En un estudio experimental realizado por Oliveira<sup>28</sup> la infusión de isoproterenol produjo anomalías cardíacas similares a las que se observan en la enfermedad de Chagas humana, incluyendo el aneurisma apical. Es de destacar que dosis relativamente bajas de isoproterenol<sup>29, 30</sup> inducen lesiones microfocales diseminadas con infiltración de células mononucleares que remedan el cuadro histoló-

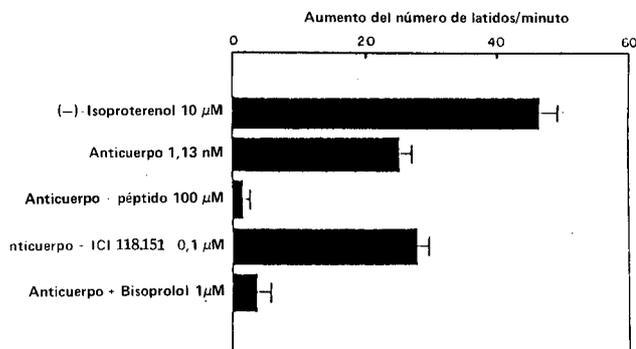


Fig. 6. Incremento del número de latidos por minuto inducido por el isoproterenol y los anticuerpos antirreceptor  $\beta$ 1 purificados en cultivos de miocitos. El efecto de los anticuerpos fue bloqueado por el antagonista  $\beta$ 1 selectivo bisoprolol pero no por el bloqueante  $\beta$ 2 selectivo ICI 118.151; es inhibido por preincubación de los anticuerpos con el péptido  $\beta$ 1. (Reproducido de Magnusson y colaboradores<sup>22</sup>.)

gico de la cardiomiopatía chagásica crónica.<sup>31</sup> El hecho de que las lesiones necróticas o degenerativas se acompañen por infiltrados mononucleares en lugar del infiltrado polimorfonuclear habitual que se observa en la necrosis miocárdica aguda<sup>24, 25, 29, 30</sup> es ciertamente llamativo. Lesiones comparables se observan durante la administración crónica de isoproterenol a ratas Wistar.<sup>32</sup> En este modelo experimental se observó: a) 34% de disminución en la densidad de receptores  $\beta$ ; b) una importante reducción de la actividad basal y máxima de la adenilato-ciclase estimulada por isoproterenol; c) una reducción del AMPc intracelular basal y en respuesta al isoproterenol; d) una gran disminución en el desarrollo de tensión máxima de tiras

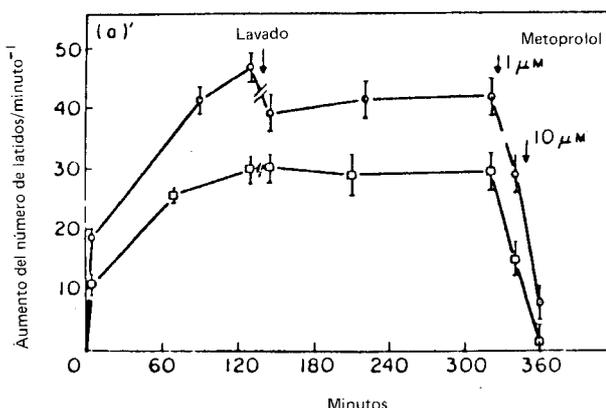


Fig. 7. Efecto cronotrópico de la IgG de dos pacientes con cardiomiopatía idiopática en cultivos de miocitos de rata neonatal. La IgG es añadida en el minuto 0. El efecto cronotrópico persiste luego del lavado y posterior incubación en un medio fresco sin globulina humana y es inhibido al agregar metoprolol.

de miocardio ventricular estimuladas con isoproterenol. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en corazones con cardiomiopatía dilatada idiopática<sup>33, 34</sup> y son congruentes con los efectos *in vitro* de los anticuerpos antirreceptores  $\beta_1$  de los pacientes con cardiomiopatía dilatada idiopática y cardiopatía chagásica crónica. Las similitudes mencionadas nos llevan a postular que el daño miocárdico crónico que se observa en la cardiomiopatía idiopática y la cardiomiopatía chagásica crónica puede ser la expresión de una "cardiomiopatía adrenérgica" mediada por el efecto estimulante crónico de los anticuerpos antirreceptores  $\beta$ . Futuros estudios pondrán a prueba esta hipótesis y permitirán demostrar si los anticuerpos antirreceptores  $\beta$  son en realidad patogénicos o se asocian con las patologías mencionadas por mera coincidencia.

Se desconoce, y es un punto crucial a investigar, si estos anticuerpos desarrollan efectos funcionales en todos los pacientes. No se puede descartar que en algunos casos los anticuerpos antirreceptores  $\beta$  carezcan de actividad funcional (como se ha observado en condiciones experimentales) y en consecuencia de efecto citotóxico. La comparación de la prevalencia de anticuerpos antirreceptores  $\beta$  funcionalmente activos en los pacientes con diferentes formas de cardiomiopatía chagásica puede proporcionar información indirecta acerca del eventual valor patogénico de estos anticuerpos. De igual importancia resulta estudiar la actividad funcional de los mismos en individuos normales y en otras cardiopatías que pudieran presentarlos.

Un hecho destacable en nuestro estudio fue la falta de correlación entre la presencia de anticuerpos antirreceptores  $\beta$  y la gravedad de la cardiomiopatía chagásica. Ello admite diversas interpretaciones. La más plausible tal vez establezca que en algunos pacientes con cardiomiopatía chagásica manifiesta la agresión inmunológica se detiene y la producción de los anticuerpos antirreceptores  $\beta$  cesa. Esta posibilidad puede explorarse con un estudio que correlacione la presencia de los anticuerpos antirreceptores  $\beta$  con la existencia de lesión miocárdica activa detectada por procedimientos no invasivos o por biopsia endomiocárdica, pero tiene cierto sustento en la existencia de formas "congeladas" que llegan a un determinado grado de compromiso miocárdico y no muestran deterioro alguno por décadas.

### Relación entre infección chagásica y anticuerpos antirreceptores $\beta$

La elevada prevalencia de anticuerpos antirreceptores  $\beta$  en pacientes con enfermedad de Chagas, aun en aquellos sin compromiso cardíaco evidente, obliga a plantear la probable vinculación entre el parásito y la reacción inmunológica que desencadena la producción de dichos anticuerpos. En otros términos, si existe algún componente del *Trypanosoma* emparentado antigénicamente con el péptido de la segunda asa extracelular del receptor  $\beta$ . Estudios recientes de nuestro grupo (observaciones inéditas) sugieren una reacción cruzada entre el antígeno Po del *T. cruzi* y el péptido  $\beta_1$ . El antígeno Po es un antígeno ribosómico con una secuencia de cinco aminoácidos (A-E-S-E-E-) próximos a la región C terminal que es homóloga a una secuencia de la segunda asa extracelular del receptor  $\beta_1$ . La reacción antirreceptor  $\beta_1$  del suero de pacientes con cardiomiopatía chagásica crónica puede ser inhibida por incubación previa con el antígeno Po y viceversa. Estos hallazgos indicarían que componentes intracelulares del parásito, tras la destrucción del mismo, son capaces de generar una respuesta inmunológica cruzada con diferentes estructuras de la membrana celular de las fibras miocárdicas.

### CONCLUSIONES

Los pacientes con enfermedad de Chagas crónica presentan una elevada prevalencia de anticuerpos antirreceptores  $\beta$  adrenérgicos, que pueden producir una activación sostenida de los receptores y desempeñar un papel importante en el mecanismo de las lesiones miocárdicas crónicas. Estas lesiones y los cambios bioquímicos concomitantes son similares a los que producen las catecolaminas, lo que sustenta la hipótesis de que la cardiomiopatía chagásica crónica (y algunas formas de cardiomiopatía dilatada idiopática) puede ser la expresión de una cardiomiopatía adrenérgica mediada por anticuerpos. Además de su posible participación en la patogenia de las cardiomiopatías chagásica y dilatada idiopática, los anticuerpos antirreceptores  $\beta$  adrenérgicos pueden ser herramientas de singular valor para el estudio de la relación estructura-función de dichos receptores.

### SUMMARY

#### ANTI BETA-ADRENERGIC RECEPTOR ANTIBODIES IN CHRONIC CHAGAS' DISEASE

##### *Background and objectives*

Recent studies have demonstrated the presence of anti

beta-adrenergic receptor antibodies in a third of the patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. These antibodies have stimulating and inhibitor effects through which they might be involved in the pathogenesis of this myocardial disease. In 1976 Sterin-Borda and col. indirectly discovered that ABA could be present in the serum and IgG of patients with Chagas' disease. Seeing as neither the prevalence of ABA nor their association to the clinical presentation forms of chronic Chagas cardiomyopathy were evaluated, the answer to these questions became the purpose of our study.

#### Methods and results

The serum of 48 patients with Chagas disease (8 with severe Chagas cardiomyopathy, 16 with "electric" Chagas cardiomyopathy and 24 without apparent cardiac impairment) and of 67 control patients (55 healthy subjects and 12 patients with heart disease other than Chagas' disease and idiopathic dilated cardiomyopathy) was analyzed. The presence of anti-beta-adrenergic receptor antibodies was detected by ELISA methods using synthetic peptides resulting from the aminoacid sequence in the type 1 (aminoacid 183 to 208) and type 2 (aminoacid 172 to 197) beta-adrenergic receptors. Results were considered positive if serum optic density exceeded control mean optic density by more than 2 standard deviations. In the serum of 16 (23.9 %) control patients anti beta-adrenergic receptor antibodies were detected, binding to type 1 (17.9 %) and/or type 2 (11.9 %) peptides. No antibodies were detected in the remaining 51 (76 %) control patients. In contrast, the serum of only 22 (45.8 %) patients with Chagas' disease were negative for anti beta-adrenergic receptor antibodies. Antibodies against type 1 and type 2 peptides were present in the serum of 23 (47.9%) and 16 (33.3%) disease patients, respectively. There were no significant differences amongst those with severe Chagas cardiomyopathy, "electric" Chagas cardiomyopathy and without apparent cardiopathy.

#### Conclusions

The results of this study show a high prevalence of anti beta-adrenergic receptor antibodies, predominantly against beta 1 adrenergic receptors, in chronic Chagas' disease. As it is not clear in which patients the anti beta-adrenergic receptor antibodies are functionally active, their role in the pathogenesis of Chagas cardiomyopathy remains unknown. Future investigations could determine the value of these antibodies in the diagnostic and therapeutic approach of Chagas' disease.

#### BIBLIOGRAFIA

- Malsch B: Immunological mechanisms in human cardiac injury. In Spry CFJ (ed): Immunology and molecular biology of cardiovascular disease. MT Press Limited, 1987; pp 225-251.
- Malsch B: Myocarditis. Current Opinion 1990; 5: 320-327.
- 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.
- Avila JL, Rojas M, Velázquez Avila G, Von der Mark H, Timpl R: Antibodies to basement membrane protein nidogen in Chagas' disease and American cutaneous leishmaniasis. J Clin Microbiol 1986; 24: 775-778.
- Neumann DA, Burek CL, Baughman KL, Rose NR, Herskowitz A: Circulating heart-reactive antibodies in patients with myocarditis or cardiomyopathy. J Am Coll Cardiol 1990; 16 (4): 836-846.
- Santos-Buch CA, Acosta AM, Zweerink HJ, Sadigursky M, Andersen OF, von Kreuler BF, Brodsky CL, Sadigursky C, Cody RJ: Primary muscle disease: definition of a 25-kDA polypeptide myopathic specific Chagas antigen. Clin Immunopathol 1985; 37: 334-350.
- Rose NR, Herskowitz A, Neumann DA, Neu N: Autoimmune myocarditis: a paradigm of post-infection autoimmune disease. Immunology Today 1988; 9 (4): 117-120.
- Wolff PG, Kuhl U, Schalthells HP: Laminin distribution and autoantibodies to laminin in dilated cardiomyopathy and myocarditis. Am Heart J 1989; 117: 1303-1309.
- Szarfman A, Terranova VP, Rennard SI, Foidant JM, Lima MF, Scheinman JI, Martin GR: Antibodies to laminin in Chagas' disease. J Exp Med 1982; 155: 1161.
- Towbin H, Rosenfeld G, Wieslander J, Avila JL, Rojas M, Szarfman A, Esser K, Nowak H, Timpl R: Circulating antibodies to mouse laminin in Chagas' disease, American cutaneous leishmaniasis and normal individuals recognize terminal galactosyl (alf-3)-galactose epitopes. J Exp Med 1987; 166: 419.
- Levin MJ, Mesri E, Benarous R, Levitus G, Shijman A, Levy-Yeyati P, Chiale PA, Ruiz AM, Kahn A, Rosenbaum MB, Torres HN, Segura EL: Identification of major *Trypanosoma cruzi* antigenic determinants in chronic Chagas' heart disease. Am J Trop Med Hyg 1989; 41 (5): 530-538.
- Levitus G, Hontebeyrie-Joskowicz M, Van Regenmortel MH, Levin MJ: Humoral autoimmune response to ribosomal P proteins in chronic Chagas' heart disease. Clin Exp Immunol 1991; 1-5.
- Schultheiss HP, Schwimbeck P, Bolte HD: Autoantibodies against the adenine nucleotide translocator in myocarditis and dilated cardiomyopathy. In Bolte HD (ed): Viral Heart Diseases. Springer Verlag, Berlin, 1983; pp 131-143.
- Morad M, Davies NW, Ulrich G, Schultheiss HP: Antibodies against ADP-ATP carrier enhance  $Ca^{2+}$  current in isolated cardiac myocytes. Am Physiol Soc 1988; 960-961.
- Sterin-Borda L, Pérez Leiros C, Wald M, Cremaschi G, Borda E: Antibodies to  $\beta 1$  and  $\beta 2$  adrenoceptors in Chagas' disease. Clin Exp Immunol 1988; 74: 349-354.
- Magnusson Y, Wallukat G, Guillet JG, Hjalmarson A, Hoebeke J: Functional analysis of rabbit anti-peptide antibodies which mimic autoantibodies against the  $\beta 1$ -adrenergic receptor in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. J of Autoimmunity 1991; 4: 893-905.
- Magnusson Y, Marullo S, Waagstein F, Andersson B, Vahine A, Guillet JG, Strosberg AD, Hjalmarson A, Hoebeke J: Mapping of a functional autoimmune epitope on the  $\beta 1$ -adrenergic receptor in patients idiopathic dilated cardiomyopathy. J Clin Invest 1990; 86: 1658-1663.
- Sterin-Borda L, Cossio PM, Gimeno M, Gimeno AL, Diez C, Laguens RP, Cabeza Meckert P, Arana RM: Effect of chagasic sera on the rat isolated atrial preparation: immunological, morphological and functional aspects. Cardiovascular Res 1976; 10: 613-622.
- Pascual J, Borda E, Cossio P, Arana R, Sterin-Borda L: Modification of sarcolemmal enzymes by chagasic IgG and its effects on cardiac contractility. Biochemical Pharmacology 1986; 35 (21): 3839-3845.
- Merrifield RB: Solid phase peptide synthesis. J Am Chem Soc 1963; 85: 2149-2154.
- Sterin-Borda L, Cantore M, Pascual M, Borda E, Cossio P, Arana R, Passeron S: Chagasic IgG binds and interacts with cardiac beta adrenoceptor-coupled adenylate cyclase system. Int J Immunopharmac 1986; 8 (6): 581-588.
- Magnusson Y, Wallukat G, Waagstein F, Hjalmarson A, Hoebeke J: Autoimmunity in idiopathic dilated cardiomyopathy. Characterization of antibodies against the

- $\beta$ 1-adrenoceptor with positive chronotropic effect. Circulation (in press).
23. Wallukat G, Mörwinski M, Kowal K, Förster A, Boewer V, Wollenberger A: Autoantibodies against the  $\beta$ -adrenergic receptor in human myocarditis and dilated cardiomyopathy:  $\beta$ -adrenergic agonism without desensitization. *Eur Heart J* 1991; *12* (Suppl D): 178-181.
  24. Van Vliet PD, Burchell HB, Titus JL: Focal myocarditis associated with pheochromocytoma. *N Engl J Med* 1966; *274* (20): 1102-1108.
  25. Rona G, Chappel C, Balazs T, Gaudry R: An infarct-like myocardial lesion and other toxic manifestations produced by isoproterenol in the rat. *Arch Pathol* 1959; *67*: 443-455.
  26. Imperato-Mc Ginley J, Gautier T, Ehlers K, Zullo MA, Goldstein DS, Vaughan ED Jr: Reversibility of catecholamine-induced cardiomyopathy in a child with a pheochromocytoma. *N Engl J Med* 1987; *316* (13): 793-797.
  27. Schaffer MS, Zuberbuhler P, Wilson G, Rose V, Duncan WJ, Rowe RD: Catecholamine cardiomyopathy: an unusual presentation of pheochromocytoma in children. *The Journal of Pediatrics* 1981; *22*: 276-279.
  28. Oliveira JSM, Mello de Oliveira JA, Frederique U Jr, Lima Filho EC: Apical aneurysm of Chagas' heart disease. *Br Heart J* 1981; *45* (4): 432-437.
  29. Ferrans VJ, Hibbs RG, Walsh JJ, Burch GE: Histochemical and electron microscopic studies on the cardiac necroses produced by sympathomimetic agents. *Ann New York Acad Sci* 1969; *156*: 309-332.
  30. Fleckenstein A: Calcium antagonism in heart and smooth muscle. Experimental facts and therapeutic prospects. John Wiley & Sons Publishers, 1983.
  31. Rosenbaum MB: Chagasic cardiomyopathy. *Prog Cardiovasc Dis* 1964; *7*: 199-225.
  32. Tse J, Powell JR, Baste CA, Priest RE, Kuo JF: Isoproterenol-induced cardiac hypertrophy: modifications in characteristics of beta-adrenergic receptor, adenylate cyclase and ventricular contraction. *Endocrinology* 1979; *105* (1): 246-255.
  33. Feldman AM, Cates AE, Veazey MB, Hershberger RE, Bristow MR, Baughman KL, Baumgartner WA, Van Dop C: Increase of the 40,000-mol wt Pertussis toxin substrate (G protein) in the failing human heart. *J Clin Invest* 1988; *82*: 189-197.
  34. Weinstein C: Myocarditis. *Human Pathology* 1987; *18* (6): 613-618.