

Artículo original

Valoración de anticuerpos con reactividad cruzada patógeno-huésped en pacientes con diferentes estadios de cardiopatía chagásica crónica

Miguel H. Vicco^{a,b,*}, Franco Ferini^b, Luz Rodeles^b, Paula Cardona^a, Iván Bontempi^a, Susana Lioi^c, Juan Beloscar^d, Takeshi Nara^e, Iván Marcipar^a y Oscar A. Bottasso^f

^aLaboratorio de Tecnología Inmunológica, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina

^bServicio de Clínica Médica, Hospital J.B. Iturraspe, Santa Fe, Argentina

^cCátedra de Química Analítica Clínica, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, Santa Fe, Argentina

^dServicio de Cardiología, Hospital Provincial del Centenario, Carrera de Especialización en Cardiología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario, Santa Fe, Argentina

^eDepartamento de Parasitología Celular y Molecular, Escuela de Medicina, Universidad de Juntendo, Tokio, Japón

^fInstituto de Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Rosario, Santa Fe, Argentina

Historia del artículo:

Recibido el 5 de abril de 2013

Aceptado el 10 de mayo de 2013

On-line el 22 de agosto de 2013

Palabras clave:

Enfermedad de Chagas

Trypanosoma cruzi

Insuficiencia cardíaca

Autoanticuerpos anti-B13

RESUMEN

Introducción y objetivos: La infección por *Trypanosoma cruzi* induce una respuesta autoinmunitaria humoral contra diferentes antígenos del huésped. En especial, los anticuerpos que presentan reactividad cruzada con antígenos del miocardio tienen un papel importante en el desarrollo de las formas graves de la cardiopatía chagásica crónica. En este trabajo se analiza la asociación del estadio clínico de la enfermedad con la presencia de autoanticuerpos en pacientes con cardiopatía chagásica crónica.

Métodos: Estudio transversal con pacientes con serología positiva para enfermedad de Chagas, categorizados en tres grupos según la clasificación de cardiopatía chagásica de Storino et al. Se realizó a todas las personas incluidas un examen clínico completo y se usaron las muestras de suero para cuantificar los autoanticuerpos.

Resultados: Todos los pacientes presentaron cantidades detectables de anti-p2β y anti B13; el anti-Na-K-ATPasa fue negativo en todos los casos. No se halló asociación significativa entre las alteraciones electrocardiográficas y los valores de autoanticuerpos. Los pacientes con cardiopatía chagásica en estadio III presentaron mayor concentración de anti-B13 y riesgo de mortalidad alto, lo que muestra una clara asociación entre el estadio de la enfermedad y la puntuación de mortalidad.

Conclusiones: La concentración del autoanticuerpo anti-B13 fue significativamente mayor en los pacientes con cardiopatía chagásica en estadio III, lo que indica que este anticuerpo puede estar involucrado en la progresión de la enfermedad y podría usarse como marcador de mal pronóstico respecto a la afección cardíaca. Los resultados revelan también una importante correlación entre el anti-B13 y la insuficiencia cardíaca sintomática y la cardiomiopatía dilatada.

© 2013 Sociedad Española de Cardiología. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Assessment of Cross-reactive Host-pathogen Antibodies in Patients With Different Stages of Chronic Chagas Disease

ABSTRACT

Introduction and objectives: *Trypanosoma cruzi* infection has been shown to induce humoral autoimmune responses against host antigens tissues. Particularly, antibodies cross-reacting with myocardial antigens may play a role in the development of the severe forms of chronic Chagas disease. The aim of this study was to determine the association between clinical stage of the disease and the presence of autoantibodies in patients with chronic Chagasic disease.

Methods: We performed a cross-sectional study in *T. cruzi*-seropositive patients divided into 3 groups according to the classic classification of chronic Chagas heart of Storino et al. All participants underwent complete clinical examination and their sera were used to measure autoantibody levels.

Results: All patients had detectable levels of anti-p2β and anti-B13 autoantibodies but none had anti-Na-K-ATPase antibodies. No association was observed between electrocardiographic conduction disturbances and autoantibody levels. Patients with chronic Chagas disease stage III had the highest levels of anti-B13 antibodies and a high risk of mortality score, showing a clear association between disease stage and this score.

Conclusions: Anti-B13 antibodies were significantly higher in chronic Chagas disease stage III patients, suggesting that these antibodies may be involved in disease progression and that they might be a useful marker of poor prognosis in terms of heart compromise. Our results also reveal an important correlation

Keywords:

Chagas disease

Trypanosoma cruzi

Heart failure

Anti-B13 autoantibodies

* Autor para correspondencia: Laboratorio de Tecnología Inmunológica, Facultad de Bioquímica y Ciencias Bioquímicas, Universidad Nacional del Litoral, Ciudad Universitaria, CC242, 3000 Santa Fe, Argentina.

Correo electrónico: mvicco@santafe-conicet.gov.ar (M.H. Vicco).

between the level of anti-B13 autoantibodies and symptomatic heart failure and/or dilated cardiomyopathy.

Full English text available from: www.revespcardiol.org/en

© 2013 Sociedad Española de Cardiología. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Abreviaturas

CCC: cardiopatía chagásica crónica
IDON: índice de la densidad óptica de autoanticuerpos en relación con el control negativo

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas, una infección parasitaria causada por el protozoo *Trypanosoma cruzi*, afecta a un mínimo de 8–10 millones de personas en América Central y del Sur. Se han descrito también casos esporádicos en Estados Unidos y Europa. Las principales complicaciones de esta enfermedad son los síndromes mega, que afectan al tracto gastrointestinal o al corazón. La cardiopatía chagásica crónica (CCC) es la manifestación más frecuente y afecta a aproximadamente un 30% de los individuos infectados por *T. cruzi*. Los trastornos cardíacos graves, como las anomalías del ritmo o de la conducción, la miocardiopatía dilatada específica o los episodios tromboembólicos, pueden causar aproximadamente 50.000 muertes anuales^{1,2}.

Los mecanismos que subyacen a la patogenia de la enfermedad de Chagas son complejos y multifactoriales^{3,4}; es probable que intervengan en ello las respuestas inmunitarias a los antígenos parasitarios^{5,6}, los procesos autoinmunitarios^{7–9} y la respuesta inflamatoria que acompaña a estas reacciones^{10–15}. Una respuesta autoinmunitaria humoral debida a la imitación molecular que muestran algunas proteínas de parásitos es uno de los mecanismos que intervienen en la patogenia de la enfermedad de Chagas. Entre los diversos autoanticuerpos descritos, se ha demostrado que el anti-p2β y el anti-B13 desempeñan un papel patógeno en la producción de las lesiones del tejido cardíaco, tanto en el ser humano como en modelos animales¹⁶. Los anticuerpos anti-p2β con reactividad cruzada con el receptor adrenérgico β1 se han observado en modelos murinos de alteraciones cardíacas, como las anomalías electrocardiográficas y la apoptosis miocitaria^{17–23}. La reactividad cruzada se atribuye al epítipo ácido antigénico presente en el extremo carboxiterminal del p2β, denominado R13 (EEEDDDMGFGLFD), que muestra similitud con el motivo ácido AESDE situado en el segundo bucle extracelular del receptor adrenérgico β1²⁴. Una determinación de los anticuerpos anti-p2β en pacientes chagásicos de diversos estadios no aportó resultados concluyentes respecto a su relación con la CCC^{25,26}. Se demostró que el antígeno B13 fomentaba una respuesta celular de autoanticuerpos contra la miosina cardíaca, debido a la homología de secuencia del epítipo de la proteína B13 (AAAGDK) del hexapéptido de cadena pesada de miosina cardíaca humana (AAALDK)^{16,27,28}. En un estudio realizado en pacientes con CCC, se observó una prevalencia elevada de anticuerpos anti-B13 en pacientes con miocardiopatía dilatada²⁵, pero no se exploró la correlación de la concentración con el grado de afección de la CCC.

Recientemente, los anticuerpos contra la ATPasa de la bomba de Na⁺/K⁺ se han asociado a una miocardiopatía dilatada idiopática y a alteraciones electrocardiográficas de la conducción^{29,30}. Es interesante señalar que la expresión de la ATPasa de la bomba de Na⁺/K⁺ por *T. cruzi* se ha considerado un mecanismo de adaptación del ciclo extracelular al intracelular³¹. Dado que la ATPasa de la bomba de Na⁺/K⁺ tiene una secuencia de aminoácidos muy conservada en el ser

humano y el parásito, los autoanticuerpos contra esta proteína pueden desempeñar un papel en la patogenia de la CCC, debido a un mecanismo de imitación molecular desecadenado por esta proteína.

Este estudio se diseñó para evaluar la presencia de las inmunoglobulinas anti-p2β y anti-B13 y el anticuerpo anti-ATPasa de bomba de Na⁺/K⁺, todavía inexplorado en pacientes con CCC. Se evaluó la posible asociación entre la concentración sérica de estos anticuerpos y el grado de afección cardíaca, y se determinó también la puntuación de riesgo de mortalidad.

MÉTODOS

Población en estudio y evaluación de los participantes

Se llevó a cabo un estudio transversal en 80 pacientes con una prueba serológica positiva para *T. cruzi*. El diagnóstico de enfermedad de Chagas se estableció según las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud con dos pruebas diferentes (ELISA y hemaglutinación indirecta o inmunofluorescencia indirecta) con resultados positivos³². Se dividió a los pacientes en tres grupos según la clasificación de la CCC de Storino et al³³. Todos los participantes inscritos procedían del servicio clínico del Hospital Iturraspe (Santa Fe, Argentina). Se les practicó una exploración clínica completa, que incluía las siguientes pruebas: hemograma completo, glucosa, potasio, creatinina, nitrógeno de urea en sangre, electrocardiograma, radiografía de tórax y abdomen y ecocardiografía Doppler. Las ecocardiografías se realizaron según el método de Acquatella³⁴. Los criterios de exclusión fueron: presencia de dos o más factores de riesgo de enfermedad coronaria o enfermedad establecida, antecedentes de otras enfermedades cardíacas, alteraciones renales, enfermedad tiroidea o cualquier otra afección sistémica, así como el tratamiento con compuestos anti-*T. cruzi* o fármacos inmunosupresores. El estudio contó con la aprobación ética del Consejo de Revisión Ética de la Universidad Nacional del Litoral. Se obtuvo el consentimiento informado de todos los pacientes.

Según la clasificación antes citada, se incluyó a: a) 30 pacientes con CCC en estadio I (es decir, con exploraciones radiológicas, electrocardiograma y ecocardiografía normales); b) 25 pacientes con CCC en estadio II (con alteraciones electrocardiográficas como bloqueo de división anterior izquierda, bloqueo de rama derecha del haz, bloqueo auriculoventricular completo, bloqueo de rama izquierda o derecha del haz de His, arritmias ventriculares complejas y bloqueo de la división anterosuperior de la rama izquierda), y c) 25 pacientes con CCC en estadio III (con insuficiencia cardíaca clínica o miocardiopatía dilatada en la ecocardiografía). La insuficiencia cardíaca clínica se definió según la guía de práctica clínica de la Sociedad Europea de Cardiología sobre diagnóstico y tratamiento de la insuficiencia cardíaca aguda y crónica 2012³⁵. Todos los pacientes de este grupo tenían diagnóstico de insuficiencia cardíaca, y en el momento de la inclusión en el estudio ninguno recibía un tratamiento específico para dicho trastorno.

Se incluyó también un grupo de control formado por 10 pacientes con miocardiopatía dilatada e insuficiencia cardíaca debida a hipertensión o enfermedad coronaria.

Expresión y purificación de proteínas

Se cultivaron células de *Escherichia coli* BL21(DE3) portadoras de las construcciones plasmídicas PET-32a/p2β, PET-32a/B13

(durante una noche) en medio LB, con suplementos de 0,1 mg × ml/1 ampicilina a 37 °C, con agitación. Se indujo la expresión proteica en 1 mM de isopropil-β-D-tiogalactopiranosido y se purificó con una columna de Ni-ácido nitrilotriacético (GE), según lo descrito en otra publicación³⁶. Se produjo una inducción de las células de *E. coli* BL21(DE3) portadoras de las construcciones plasmídicas pET28a/TcENA (como ATPasa de la bomba de Na⁺/K⁺) mediante la incubación de las células en 1 mM de isopropil-β-D-tiogalactopiranosido. Se lisaron las células bacterianas mediante sonicación y se precipitaron mediante centrifugación a 10.000 × g durante 10 min a 4 °C. El precipitado resultante se solubilizó con 8 mol UREA, se incubó con TALON Metal Affinity Resin (BD Biosciences; San Jose, California, Estados Unidos) y se dializó, según lo descrito por Izumi et al³¹.

Determinaciones de anticuerpos

Se obtuvieron muestras de suero mediante punción venosa convencional y se determinaron los anticuerpos mediante inmunoanálisis (ELISA). Se recubrieron placas de microtitulación con 0,5 μg del antígeno específico en tampón de carbonato-bicarbonato 0,05 M, a pH 9,6, y se incubaron (durante una noche) a 4 °C. Se bloquearon las placas con albúmina de suero bovino al 5% y se incubaron con una dilución de 1:100 de suero humano por duplicado. Las placas se leyeron a 450 nm en un lector de ELISA (BioRad). Todas las muestras de suero se evaluaron por duplicado y se tomó como resultado de la prueba la media del valor de densidad óptica de estas determinaciones simultáneas. En cada placa se analizaron simultáneamente 6 controles negativos (individuos sanos seronegativos para *T. cruzi*)³⁶. Se calcularon valores de corte estándares con ELISA negativo tomando la media de la densidad óptica de las muestras de suero negativas más 2 desviaciones estándares. La cantidad de anticuerpos se expresó mediante un índice que indica la relación entre la densidad óptica de la muestra y la densidad óptica de los valores de corte estándares negativos. Se denomina a este índice IDON (índice de la densidad óptica de autoanticuerpos en relación con el control negativo). Un IDON ≤ 1 se consideró negativo³⁶⁻³⁸.

Puntuación de mortalidad

Se aplicó a todos los pacientes la puntuación de riesgo para la predicción de muerte en cardiopatía chagásica^{39,40}. Se incluyó a los pacientes en los grupos de riesgo bajo y alto porque no los hubo de riesgo intermedio.

Análisis estadístico

Los datos se analizaron con el programa MedCalc versión 12.2.1. La distribución normal de las variables continuas se evaluó con el método de Kolmogorov-Smirnov. Los datos se expresan en forma de media ± desviación estándar o la mediana [intervalo intercuartílico]. Se compararon los grupos en lo relativo a edad, concentración de anticuerpos y estadio de la CCC. Se utilizó la prueba de la χ^2 o la prueba exacta de Fisher para las variables discretas y un análisis de la varianza de una vía (prueba de Student-Newman-Keuls para todas las comparaciones por pares) para comparar las medias de valores de IDON y la edad de los grupos definidos según el estadio de la CCC. Se aplicaron modelos de regresión logística binaria múltiple para evaluar la influencia de las variables asociadas ($p < 0,05$) a la insuficiencia cardíaca en la enfermedad de Chagas. Los factores de confusión y los factores de riesgo independientes se incluyeron en el modelo de regresión logística final. Se construyó una curva *receiver operating characteristic* para explorar si el IDON de anticuerpos era útil para diferenciar entre los pacientes con diferentes estadios de CCC. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Población general

La media de edad de los sujetos de la muestra era $55 \pm 12,4$ años; el 56% eran mujeres. No hubo diferencias entre los grupos en cuanto a la distribución de edades o sexos. Los pacientes con una CCC en estadio III no tenían conciencia de haber contraído una infección por *T. cruzi* hasta que ingresaron en el hospital a causa de una insuficiencia cardíaca. Tan solo 12 pacientes con CCC en estadios I o II sabían que tenían enfermedad de Chagas. Los demás pacientes con CCC fueron diagnosticados mediante un examen de selección inicial debido a una epidemiología positiva en cuanto a la enfermedad de Chagas.

Tenían hipertensión y recibían tratamiento con enalapril 12 pacientes con CCC en estadio II y 6 con CCC en estadio III. Todos los pacientes del grupo control eran también hipertensos y recibían tratamiento con inhibidores de la enzima de conversión de la angiotensina y bloqueadores beta. La presión arterial sistólica fue significativamente inferior en los pacientes en estadio I en comparación con los de los demás grupos (prueba de Kruskal Wallis, $p = 0,0042$).

Las características de los pacientes de cada grupo y la distribución de los anticuerpos se resumen en la [tabla 1](#).

Alteraciones electrocardiográficas

Las alteraciones electrocardiográficas más frecuentes en la CCC en estadios II y III fueron el bloqueo de división anterior izquierda con bloqueo de rama derecha del haz ($n = 12$), el bloqueo de rama derecha del haz ($n = 7$) y la fibrilación auricular asociada a bloqueo de rama derecha del haz ($n = 7$). Se observó la presencia de bradicardia sinusal en 4 pacientes con CCC en estadio II, mientras que 2 pacientes con CCC en estadio III tenían un bloqueo auriculoventricular de tercer grado que requirió la implantación de un marcapasos. Las alteraciones observadas en el grupo control de pacientes con miocardiopatía dilatada fueron: fibrilación auricular ($n = 4$), hipertrofia ventricular izquierda ($n = 3$), fibrilación auricular y bloqueo de rama derecha del haz ($n = 2$) y bloqueo de división anterior izquierda y bloqueo de rama derecha del haz ($n = 1$). No se observó asociación alguna entre las alteraciones electrocardiográficas de la conducción y la hipertensión o los valores de IDON para los anticuerpos anti-p2β y anti-B13. No hubo diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la frecuencia de registros electrocardiográficos patológicos entre los pacientes con CCC (estadios II y III) y el grupo control.

Signos ecocardiográficos

De los pacientes del grupo de CCC II, 4 presentaban hipocinesia septal apical sin alteración diastólica ni sistólica y 2 pacientes tenían hipertrofia ventricular concéntrica. De los 25 pacientes con CCC III, el 53% presentaba miocardiopatía dilatada general con reducción de la fracción de eyección, un 30% tenía crecimiento auricular izquierdo y una relajación ventricular izquierda anormal, con insuficiencia cardíaca diastólica, y el 17% presentaba hipertrofia ventricular concéntrica con alteración diastólica. En el grupo control, 7 pacientes presentaban hipocinesia de las paredes ventriculares izquierdas asociada a un crecimiento de las cavidades izquierdas y reducción de la fracción de eyección, 2 pacientes tenían miocardiopatía dilatada general y los demás presentaban hipocinesia septal apical asociada a una relajación ventricular izquierda anormal e insuficiencia cardíaca diastólica.

Tal como se esperaba, la hipertensión se asociaba a hipertrofia ventricular concéntrica ($p = 0,04$).

Tabla 1
Características de los pacientes con cardiopatía chagásica crónica de los diversos grupos

	Cardiopatía chagásica crónica				p
	I (n = 30)	II (n = 25)	III (n = 25)	Control (n = 10)	
Edad	49,7 ± 12	53,5 ± 11	58,4 ± 8	61,1 ± 5	0,012 ^a
Sexo (%)					
Varones	30	48	48	60	NS
Mujeres	70	52	52	40	
Presión arterial sistólica (mmHg)	120 ± 11	130 ± 10	130 ± 10	130 ± 10	0,0042 ^b
Presión arterial diastólica (mmHg)	80 ± 10	80 ± 10	90 ± 10	90 ± 10	0,3
Puntuación de riesgo de muerte (%)					
Riesgo alto	—	—	100	No procede	< 0,001 ^c
Riesgo bajo	100	100	—		
Insuficiencia cardíaca (%)	0	0	100	100	< 0,001 ^d
Fracción de eyección ventricular izquierda (%)	51,2 ± 9,83	48,35 ± 10,7	38,1 ± 8,65	40,2 ± 6,83	0,03 ^e
Anticuerpos					
IDON-p2β	1,833 ± 1,03	1,806 ± 1,145	2,178 ± 1,310	0,719 ± 0,243	0,001 ^f
IDON-B13	4,797 ± 2,333	5,634 ± 2,056	9,388 ± 2,505	0,687 ± 0,136	< 0,001 ^g

CCC: cardiopatía chagásica crónica; IDON: índice de la densidad óptica de autoanticuerpos en relación con el control negativo; NS: no significativo. Las variables cuantitativas se expresan en forma de media ± desviación estándar y las cualitativas, en forma de proporciones y porcentajes.

^a CCC III y grupo control difieren de CCC I y CCC II.

^b CCC I difiere de CCC II, CCC III y CG.

^c CCC III difiere de CCC I y CCC II.

^d CCC III difiere de CCC I y CCC II.

^e CCC III y grupo control difieren de CCC I y CCC II.

^f El grupo control difiere de los demás grupos.

^g CCC III difiere de los demás grupos.

Anticuerpos

Todos los pacientes con enfermedad de Chagas presentaban concentraciones detectables de autoanticuerpos anti-p2β (2.007 a 11.207) y anti-B13 (1.950 a 13.525), mientras que ninguno tenía anticuerpos anti-Na-K-ATPasa. Todos los pacientes del grupo control presentaron unos resultados negativos. La concentración de anticuerpos no se correlacionaba con la distribución por edad o sexo ni con otras variables adicionales, como la hipertensión o el tratamiento con enalapril.

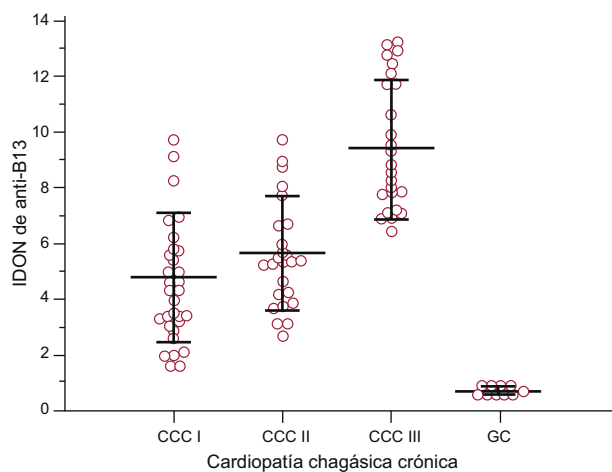


Figura 1. Valores del índice de la densidad óptica de autoanticuerpos en relación con el control negativo de anti-B13 según el grado de cardiopatía chagásica crónica y en el grupo control. Las líneas corresponden a media ± desviación estándar. Los valores del índice de la densidad óptica de autoanticuerpos en relación con el control negativo de anti-B13 en los pacientes en estadio III fueron significativamente diferentes de las de los demás grupos. Cociente F de análisis de la varianza = 24,58 ($p < 0,001$) (prueba de Student-Newman-Keuls para todas las comparaciones por pares, $p < 0,05$). CCC: cardiopatía chagásica crónica; GC: grupo control; IDON: índice de la densidad óptica de autoanticuerpos en relación con el control negativo.

La comparación de los anticuerpos anti-p2β no reveló ninguna diferencia entre los grupos en los pacientes con CCC, mientras que los pacientes con CCC III fueron los que presentaban los valores más altos de IDON para los anticuerpos anti-B13 (cociente F = 37,32; $p < 0,001$) (fig. 1). Este grupo mostró una clara asociación con la insuficiencia cardíaca y un riesgo elevado de puntuación de mortalidad elevada (prueba exacta de Fisher, $p < 0,001$).

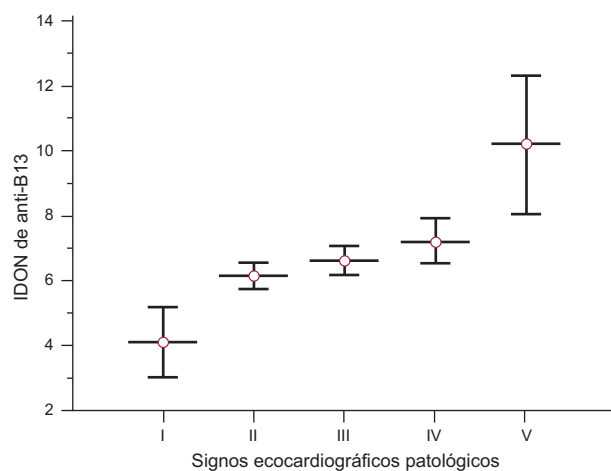


Figura 2. Valores del índice de la densidad óptica de autoanticuerpos en relación con el control negativo de anti-B13 según los signos ecocardiográficos patológicos. I: ecocardiografía normal; II: hipocinesia apical-septal; III: hipertrofia ventricular concéntrica; IV: crecimiento auricular izquierdo y relajación ventricular izquierda anormal, con insuficiencia cardíaca diastólica; V: miocardiopatía dilatada general con fracción de eyección reducida; IDON: índice de la densidad óptica de autoanticuerpos en relación con el control negativo. Las líneas corresponden a mediana ± desviación estándar. Los pacientes con miocardiopatía dilatada y fracción de eyección reducida presentaban un aumento significativo del valor del índice de la densidad óptica de autoanticuerpos en relación con el control negativo en comparación con los pacientes sin esa alteración. Cociente F de análisis de la varianza = 61,91 ($p < 0,001$) (prueba de Student-Newman-Keuls para todas las comparaciones por pares, $p < 0,05$).

Tabla 2
Resumen de variables y odds ratio

Variables	OR (IC95%)	p
Edad	1,04 (0,97-1,12)	0,2
Sexo		
Varones	0,53 (0,08-3,35)	0,5
Mujeres	1,88 (0,29-11,93)	0,5
Hipertensión	1,10 (0,19-6,64)	0,9
Tabaquismo	1,65 (0,16-16,26)	0,6
Consumo de alcohol	0,52 (0,06-4,00)	0,5
Anticuerpos		
IDON-p2β	0,80 (0,57-1,10)	0,1
IDON-B13	2,00 (1,50-3,43)	0,0002

IC95%: intervalo de confianza del 95%; IDON: índice de la densidad óptica de autoanticuerpos en relación con el control negativo; OR: odds ratio.

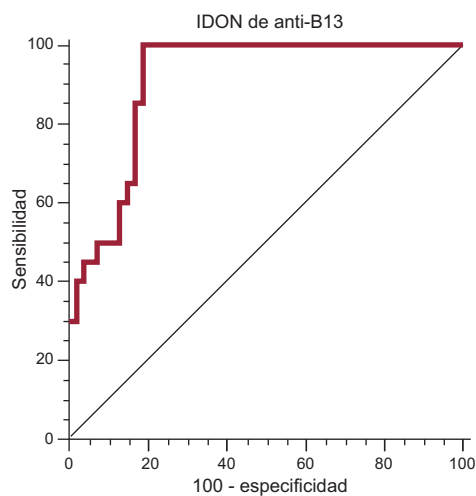


Figura 3. Curva receiver operating characteristic del índice de la densidad óptica de autoanticuerpos en relación con el control negativo anti-B13 como marcador serológico de la cardiopatía chagásica crónica en estadio III. Área bajo la curva, 0,87% ($p < 0,001$) para el índice de la densidad óptica de autoanticuerpos en relación con el control negativo de anti-B13 = 6,655. Sensibilidad del 99% (intervalo de confianza del 95%, 78,2-99,0) y especificidad del 74,58% (intervalo de confianza del 95%, 61,6-85,0). IDON: índice de la densidad óptica de autoanticuerpos en relación con el control negativo.

No hubo diferencias estadísticamente significativas entre el grado de miocardiopatía determinado mediante ecocardiografía y el IDON de autoanticuerpos. Al excluir del análisis a los pacientes hipertensos, observamos que los valores de IDON de anticuerpos anti-B13 aumentaban con la progresión de los signos ecocardiográficos patológicos (fig. 2). Además, los pacientes con miocardiopatía dilatada y fracción de eyección reducida presentaban un aumento del valor de IDON de anti-B13 en comparación con los pacientes sin esa alteración ($p < 0,001$) en las poblaciones que eran serológicamente positivas para la enfermedad de Chagas. Los pacientes con una puntuación de mortalidad elevada presentaban valores de IDON anti-B13 superiores a los de los pacientes de bajo riesgo ($p < 0,001$).

Se realizó una regresión logística binaria múltiple para predecir la insuficiencia cardíaca clínica empleando las variables discretas hipertensión, sexo, tabaquismo y consumo de alcohol, y las variables continuas edad, valor de IDON anti-p2β e IDON anti-B13. El criterio de Wald puso de manifiesto que tan solo el IDON anti-B13 contribuía de manera significativa a la predicción (odds ratio = 2; intervalo de confianza del 95% [IC95%], 1,501-3,430;

$p = 0,0002$), que mostraba una relación lineal (tabla 2). Se calculó también la curva receiver operating characteristic del IDON anti-B13, que produjo un área bajo la curva del 0,87% ($p < 0,001$) para un IDON anti-B13 de 6,655, con una sensibilidad del 99% (IC95%, 78,2-99,0) y una especificidad del 74,58% (IC95%, 61,6-85,0) (fig. 3).

DISCUSIÓN

La respuesta autoinmunitaria contra los antígenos miocárdicos puede desempeñar un papel en el desarrollo de las formas graves de CCC¹⁶. En el presente estudio, se evaluó la influencia de la imitación molecular en el fomento de la respuesta de anticuerpos autoinmunitarios en los pacientes con cardiopatía.

Como objetivo adicional relacionado con el análisis de autoanticuerpos, se evaluó si la ATPasa de la bomba de Na^+/K^+ de *T. cruzi* inducía una reacción autoinmunitaria. Estos anticuerpos no se han investigado anteriormente en pacientes con enfermedad de Chagas, pero se ha detectado su presencia en otros pacientes con miocardiopatía. Nuestra hipótesis fue que estos autoanticuerpos pueden ser inducidos por la infección parasitaria, teniendo en cuenta el análisis filogenético anteriormente presentado, que indica que las ATPasas de Na^+/K^+ e H^+/K^+ de tipo IIC de organismos de diferentes reinos tienen secuencias conservadas, excepto en las regiones aminoterminal y carboxiterminal, que son muy variables⁴¹. No se pudo identificar anticuerpos contra la proteína de la bomba de cationes del parásito en ninguno de los pacientes con enfermedad de Chagas. Aunque el parásito debe expresar esta bomba para poder sobrevivir en el interior de la célula huésped³¹, parece claro que la inmunogenicidad de este antígeno, la cantidad de antígeno o las vías de presentación antigénica no desencadenan una proliferación de clones de células B dirigidas contra este antígeno en la infección humana por *T. cruzi*. En consecuencia, es posible que este antígeno no intervenga en la producción de anticuerpos impulsada por la imitación molecular.

De entre los autoanticuerpos de aparición promovida por los antígenos del parásito, el anti-p2β y el anti-B13 son los mejor caracterizados. Estos anticuerpos se han detectado en los sueros de animales infectados experimentalmente y en los de pacientes con enfermedad de Chagas^{16,27,42}. Algunos estudios indican que estos anticuerpos pueden inducir alteraciones funcionales y estructurales del tejido cardíaco durante la enfermedad de Chagas experimental^{9,17-24,43,44}. Además, nuestros resultados indican que los pacientes con CCC tenían anticuerpos contra las secuencias peptídicas tanto del receptor adrenérgico como de la miosina cardíaca. El anti-p2β estaba presente en toda la población en estudio, y no había diferencias entre los grupos ni relación alguna con las manifestaciones clínicas. Estos resultados concuerdan con los de otros estudios. Talvani et al²⁶ no observaron correlación alguna entre el anti-p2β y los diferentes estadios de la CCC, pero utilizaron un tamaño muestral pequeño. Brenière et al²⁵ tampoco observaron ninguna asociación entre los valores de anti-p2β y las alteraciones del electrocardiograma, aunque en el estudio no se incluyó a pacientes con insuficiencia cardíaca. En el presente estudio, el grado de signos ecocardiográficos patológicos, alteraciones electrocardiográficas de la conducción e insuficiencia cardíaca no mostró relación alguna con las cifras de anticuerpos anti-p2β. Por lo que respecta al anti-B13, Cunha-Neto et al²⁷ señalaron que los anticuerpos con reactividad cruzada entre miosina cardíaca y B13 estaban presentes en todos los pacientes con enfermedad de Chagas con insuficiencia cardíaca, pero solo en el 14% de los pacientes seropositivos para *T. cruzi* asintomáticos. Todos los pacientes serológicamente positivos para la enfermedad de Chagas incluidos en nuestro estudio presentaban anticuerpos anti-B13, tal como se ha descrito anteriormente⁴⁵, y sus valores fueron significativamente mayores en los que tenían CCC en estadio III. Además, la comparación de la cantidad

de anti-B13 en relación con los signos ecocardiográficos patológicos mostró que estos autoanticuerpos aumentaban a medida que progresaba la afección cardíaca estructural.

CONCLUSIONES

Nuestros resultados reflejan una importante correlación entre concentración de autoanticuerpos anti-B13 y la insuficiencia cardíaca sintomática y los signos patológicos en la ecocardiografía, lo que indica que estos anticuerpos pueden estar involucrados en la progresión de la enfermedad. Sin embargo, se necesitan estudios longitudinales para determinar si los autoanticuerpos anti-B13 pueden tener valor predictivo en la CCC.

AGRADECIMIENTOS

Estudio financiado por CONICET (Consejo Nacional de Investigación Científica y Técnica) y por la Universidad Nacional del Litoral (Santa Fe, Argentina). MHV e IB son becarios de investigación de CONICET. ISM y OB son investigadores de carrera de CONICET.

CONFLICTO DE INTERESES

Ninguno.

BIBLIOGRAFÍA

- Control of Chagas disease: second report of a WHO expert committee. World Health Organ Tech Rep Ser. 2002;905:1–109.
- Organización Panamericana de la Salud. Estimación cuantitativa de la enfermedad de Chagas en las Américas. Montevideo, Uruguay: OMS; 2006.
- Marín-Neto JA, Rassi Jr A. Actualización sobre la cardiopatía de la enfermedad de Chagas en el primer cenenario de su descubrimiento. Rev Esp Cardiol. 2009;62:1211–6.
- Da Silva CA, Fattori A, Sousa AL, Mazon SB, Monte Alegre S, Almeida EA, et al. Determinación de la concentración plasmática de proteína C reactiva en pacientes con diferentes formas clínicas de la enfermedad de Chagas. Rev Esp Cardiol. 2010;63:1096–9.
- Almeida HO, Teixeira VPA, Dos Reis MA, Franciscan JU, Martins E. Modificações nucleares em células parasitadas pelo *Trypanosoma cruzi* em chagásicos crônicos. Rev Soc Bras Med Trop. 1987;20:147–51.
- Almeida HO, Brandão MC, Dos Reis MA, Gobbi H, Teixeira VPA. Denervação e cardiopatía no chagásico crónico. Arq Bras Cardiol. 1987;48:43–7.
- Gironès N, Fresno M. Etiology of Chagas disease myocarditis: autoimmunity, parasite persistence, or both? Trends Parasitol. 2003;19:19–22.
- Kalil J, Cunha-Neto E. Autoimmunity in chagas disease cardiomyopathy: Fulfilling the criteria at last? Parasitol Today. 1996;12:396–9.
- Leon JS, Engman DM. Autoimmunity in Chagas heart disease. Int J Parasitol. 2001;31:555–61.
- Brener Z, Gazzinelli RT. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. Int Arch Allergy Immunol. 1997;114:103–10.
- Higuchi ML, De Moraes CF, Pereira Barreto AC, Lopes EA, Stolf N, Bellotti G, et al. The role of active myocarditis in the development of heart failure in chronic Chagas' disease: a study based on endomyocardial biopsies. Clin Cardiol. 1987;10:665–70.
- Pontes-de-Carvalho L, Santana CC, Soares MB, Oliveira GG, Cunha-Neto E, Ribeiro-dos-Santos R. Experimental chronic Chagas' disease myocarditis is an autoimmune disease preventable by induction of immunological tolerance to myocardial antigens. J Autoimmun. 2002;18:131–8.
- Soares MB, Pontes-de-Carvalho L, Ribeiro-dos-Santos R. The pathogenesis of Chagas' disease: when autoimmune and parasite-specific immune responses meet. An Acad Bras Cienc. 2001;73:547–59.
- Coura JR, Viñas PA. Chagas disease: a new worldwide challenge. Nature. 2010;465:S6–7.
- Coura JR, Borges-Pereira J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. Acta Trop. 2010;115:5–13.
- Cunha-Neto E, Teixeira PC, Nogueira LG, Kalil J. Autoimmunity Adv Parasitol. 2011;76:129–52.
- Cremaschi G, Fernández M, Gorelik G, Goin J, Fossati C, Zwirner N, et al. Modulatory effects on myocardial physiology induced by an anti- monoclonal antibody involve recognition of major antigenic epitopes from β -adrenergic and M-muscarinic cholinergic receptors without requiring receptor cross-linking. J Neuroimmunol. 2004;153:99–107.
- Joensen L, Borda E, Kohout T, Perry S, García G, Sterin-Borda L. *Trypanosoma cruzi* antigen that interacts with the β 1-adrenergic receptor and modifies myocardial contractile activity. Mol Biochem Parasitol. 2003;127:169–77.
- Ferrari I, Levin MJ, Wallukat G, Elies R, Lebesgue D, Chiale P, et al. Molecular mimicry between the immunodominant ribosomal protein P0 of *Trypanosoma cruzi* and a functional epitope on the human beta 1-adrenergic receptor. J Exp Med. 1995;182:59–65.
- Labovsky V, Smulski CR, Gómez K, Levy G, Levin MJ. Anti-beta1-adrenergic receptor autoantibodies in patients with chronic Chagas heart disease. Clin Exp Immunol. 2007;148:440–9.
- Grippe V, Niborski LL, Gomez KA, Levin MJ. Human recombinant antibodies against *Trypanosoma cruzi* ribosomal P2 β protein. Parasitology. 2011;138:736–47.
- Levy GV, Tasso LM, Longhi SA, Rivello HG, Kytö V, Saukko P, et al. Antibodies against the *Trypanosoma cruzi* ribosomal P proteins induce apoptosis in HL-1 cardiac cells. Int J Parasitol. 2011;41:635–44.
- Matsui S, Fu ML, Katsuda S, Hayase M, Yamaguchi N, Teraoka K, et al. Peptides derived from cardiovascular G-protein-coupled receptors induce morphological cardiomyopathic changes in immunized rabbits. J Mol Cell Cardiol. 1997;29:641–55.
- López Bergami P, Scaglione J, Levin MJ. Antibodies against the carboxyl-terminal end of the *Trypanosoma cruzi* ribosomal P proteins are pathogenic. FASEB J. 2001;15:2602–12.
- Brenière SF, Bosseno MF, Noireau F, Yacsik N, Liegeard P, Aznar C, et al. Integrate study of a Bolivian population infected by *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002;97:289–95.
- Talvani A, Rocha MO, Ribeiro AL, Borda E, Sterin-Borda L, Teixeira MM. Levels of anti-M2 and anti-beta1 autoantibodies do not correlate with the degree of heart dysfunction in Chagas' heart disease. Microbes Infect. 2006;8:2459–64.
- Cunha-Neto E, Coelho V, Guilherme L, Fiorelli A, Stolf N, Kalil J. Autoimmunity in Chagas' disease. Identification of cardiac myosin-B13 *Trypanosoma cruzi* protein crossreactive T cell clones in heart lesions of a chronic Chagas' cardiomyopathy patient. J Clin Invest. 1996;98:1709–12.
- Abel LC, Kalil J, Cunha Neto E. Molecular mimicry between cardiac myosin and *Trypanosoma cruzi* antigen B13: identification of a B13-driven human T cell clone that recognizes cardiac myosin. Braz J Med Biol Res. 1997;30:1305–8.
- Yoshikawa T, Baba A, Nagatomo Y. Autoimmune mechanisms underlying dilated cardiomyopathy. Circ J. 2009;73:602–7.
- Baba A, Yoshikawa T, Ogawa S. Autoantibodies produced against sarcolemmal Na-K-ATPase: Possible upstream targets of arrhythmias and sudden death in patients with dilated cardiomyopathy. J Am Coll Cardiol. 2002;40:1153–9.
- Iizumi K, Mikami Y, Hashimoto M, Nara T, Hara Y, Aoki T. Molecular cloning and characterization of ouabain-insensitive Na(+)-ATPase in the parasitic protist *Trypanosoma cruzi*. Biochim Biophys Acta. 2006;1758:738–46.
- Marcipar IS, Lagier CM. Advances in serological diagnosis of Chagas' disease by using recombinant proteins. En: Rodríguez-Morales A, editor. Current topics in tropical medicine. Rijeka, Croacia: InTech; 2012. Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/current-topics-in-tropical-medicine/advances-in-serological-diagnosis-of-chagas-disease-by-using-recombinant-proteins>
- Storino R, Schapachnik E, Barousse J, Leguizamón Palumbo J, Manigot D, De Rosa M, et al. Clasificación clínica de la miocardiopatía chagásica crónica e historia natural. Bol Acad Nac Med B Aires. 1985;63:160.
- Acquatella H. Echocardiography in Chagas heart disease. Circulation. 2007;115:1124–31.
- McMurray JJ, Adamopoulos S, Anker SD, Auricchio A, Böhm M, Dickstein K, et al. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. Eur Heart J. 2012;33:1787–847.
- Camussonne C, Gonzalez V, Belluzo MS, Pujato N, Ribone ME, Lagier CM, et al. Comparison of recombinant *Trypanosoma cruzi* peptide mixtures versus multi-epitope chimeric proteins as sensitizing antigens for immunodiagnosis. Clin Vaccine Immunol. 2009;16:899–905.
- Tijssen P. Processing of data and reporting of results of enzymeimmunoassays. En: Practice and theory of enzymeimmunoassays. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. Amsterdam: Elsevier; 1985: 385–421.
- Wright PF, Nilsson E, Van Rooij EM, Lelenta M, Jeggo MH. Standardisation and validation of enzyme-linked immunosorbent assay techniques for the detection of antibody in infectious disease diagnosis. Rev Sci Tech. 1993;12:435–50.
- Rassi Jr A, Rassi A, Little WC, Xavier SS, Rassi SG, Rassi AG, et al. Development and validation of a risk score for predicting death in Chagas' heart disease. N Engl J Med. 2006;355:799–808.
- Barbosa MM, Nunes MCP. Estratificación del riesgo en la enfermedad de Chagas. Rev Esp Cardiol. 2012;65 Suppl 2:17–21.
- Axelsen KB, Palmgren MG. Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily. J Mol Evol. 1998;46:84–101.
- Borda ES, Sterin-Borda L. Antiadrenergic and muscarinic receptor antibodies in Chagas cardiomyopathy. Int J Cardiol. 1996;54:149–56.
- Cunha-Neto E, Duranti M, Gruber A, Zingales B, De Messias I, Stolf N, et al. Autoimmunity in Chagas disease cardiopathy: biological relevance of a cardiac myosin-specific epitope crossreactive to an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. Proc Natl Acad Sci USA. 1995;92:3541–5.
- Masuda MO, Levin M, De Oliveira SF, Dos Santos Costa PC, Bergami PL, Dos Santos Almeida NA, et al. Functionally active cardiac antibodies in chronic Chagas' disease are specifically blocked by *Trypanosoma cruzi* antigens. FASEB J. 1998;12:1551–8.
- Umezawa ES, Bastos SF, Camargo ME, Yamauchi LM, Santos MR, Gonzalez A, et al. Evaluation of recombinant antigens for serodiagnosis of Chagas' disease in South and Central America. J Clin Microbiol. 1999;37:1554–60.