

## ANTICUERPOS ANTI-RECEPTORES $\beta$ 1 ADRENÉRGICOS EN PACIENTES CON ENFERMEDAD DE CHAGAS: ESTANDARIZACION DE LA PRUEBA (ELISA) CON EL PEPTIDO SINTETICO DE LA SEGUNDA ASA EXTRACELULAR DEL RECEPTOR $\beta$ 1 ADRENÉRGICO

### ANTIBODIES ANTI - RECEPTOR $\beta$ 1 ADRENERGIC CHAGAS DISEASE PATIENTS: STANDARIZATION TEST (ELISA) WITH SYNTHETIC PEPTIDE OF THE SECOND EXTRACELLULAR RECEIVER ASA $\beta$ 1 ADRENERGIC

EGLYS MARQUEZ<sup>1</sup>, ZORAIDA DIAZ<sup>2</sup>, ARTURO MUÑOZ<sup>3</sup> Y BELKISYOLE ALARCÓN DE NOYA<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Universidad Central de Venezuela. Facultad de Ciencias. Emarquez\_26@hotmail.com

<sup>2</sup>Sección de Inmunología, Instituto de Medicina Tropical (UCV). Zoraida\_diaz@yahoo.com

<sup>3</sup>Sección de Inmunología, Instituto de Medicina Tropical (UCV). Arturomc35@gmail.com

<sup>4</sup>Sección de Inmunología, Instituto de Medicina Tropical (UCV). belkisuole@gmail.com

### Resumen

La Enfermedad de Chagas (ECh), es causada por el agente etiológico *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) y es el principal causante de cardiomiopatías crónicas en América Latina. Probablemente el daño cardiaco es la consecuencia no solamente de la persistencia del parásito en el tejido cardiaco sino también de una regulación defectuosa de la respuesta inmunitaria (teoría autoinmune) derivada de la auto-reactividad contra antígenos propios. Se ha demostrado la presencia de anticuerpos dirigidos contra la segunda asa extracelular del receptor  $\beta$ 1 adrenérgico en suero de pacientes con ECh. La estandarización de la prueba es necesaria para garantizar la obtención de resultados confiables y comparativos en la determinación de la presencia de anticuerpos anti- $\beta$ 1 adrenérgicos en pacientes en fases tempranas de la infección y vigilar de cerca su evolución clínica. Se ensayaron diferentes concentraciones del antígeno (30  $\mu$ g/ml, 50  $\mu$ g/ml y 70  $\mu$ g/ml), diluciones de los sueros (1/20, 1/50, 1/60) y del conjugado (anti-IgG humano, acoplado a fosfatasa alcalina) en placas de 96 pozos con sueros de personas con ECh con alta, media y baja reactividad en el ELISA de diagnóstico así como de personas negativas a fin de fijar el punto de corte de la prueba. Las condiciones evaluadas para la estandarización de la prueba resultaron apropiadas para la detección de los anticuerpos anti- $\beta$ 1 adrenérgicos en pacientes con Enfermedad de Chagas.

**Palabras clave:** Enfermedad de Chagas; ELISA; receptores  $\beta$ 1 adrenérgico; Estandarización; péptidos sintéticos.

## Abstract

Chagas disease is caused by the etiologic agent *trypanosomacruzi* (*T. cruzi*) and is the main cause of chronic cardiomyopathy in Latin America. Probably the heart damage is a result not only the persistence of the parasite in the cardiac tissue but also of a defective regulation of the immune response (autoimmune theory). It has demonstrated the presence of antibodies directed against the second extracellular loop  $\beta 1$  adrenergic receptor in serum of patients with Ech. The standardization of testing is necessary to ensure obtaining reliable results and comparative, the objective study was performed to standardize the test (ELISA) for the detection of anti- $\beta 1$  adrenergic antibodies in patients with Ech, were determined optimal concentrations of antigen (30  $\mu\text{g/ml}$ , 50  $\mu\text{g/ml}$  y 70  $\mu\text{g/ml}$ ), optimal dilution of sera (1/20, 1/50, 1/60) and the optimal conjugate title (anti - human IgG, coupled to alkaline phosphatase) in 96-well plates with serums of high, medium and low reactivity. To discriminate positive sera from negative the cutoff was determined. It was selected as the optimal concentration of antigen 50  $\mu\text{g/ml}$  dilutions of serum 1/50 and conjugate 1/500 the cut that was set at D.O 0,278 nm. The conditions evaluated for standardized testing, were appropriate for the detection of anti- $\beta 1$  adrenergic antibodies in patients with Chagas disease.

**Keywords:** Chagas disease; ELISA;  $\beta 1$  adrenergic receptor; Standardization; synthetic peptide.

## Introducción

La Enfermedad de Chagas (ECh) ó tripanosomiasis americana es causada por el agente etiológico *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) y es el principal causante de cardiomiopatías crónicas en América Latina, encontrándose alrededor de 8 millones de personas infectadas (World Health Organization, 2014). Esta enfermedad se caracteriza por presentar una fase aguda y crónica, separadas por un periodo indeterminado que puede durar meses o décadas durante el cual los pacientes son relativamente asintomáticos (Oliveira *et al* 1997; Storino 1994; Viotti y Vigliano 2015).

Existen controversias y aún no están claramente establecidos los mecanismos causantes de la patología cardiaca y las causas reales por las cuales un individuo puede evolucionar o no hacia una cardiopatía. Sin embargo, a través del análisis comparativo de distintos pacientes con ECh se ha logrado inferir la existencia de diversos factores que condicionan en un porcentaje de la población infectada el desarrollo de la fase crónica cardiopata, entre ellas: la predisposición genética del hospedador, lesiones producidas por el parásito y respuesta del sistema inmunitario (Dutra *et al*, 2009).

Se estima que el daño cardiaco se debe no solo a la persistencia del parásito en el tejido cardiaco sino también a una regulación defectuosa de la respuesta inmunitaria de una auto-reactividad innata y adaptativa contra antígenos propios del organismo (Brener *et al*, 2000). Varios estudios han demostrado la presencia de anticuerpos dirigidos contra la segunda asa extracelular del receptor  $\beta 1$  adrenérgico en suero de pacientes con enfermedad de Chagas (Sterin-Borda *et al*, 1976; Magnusson *et al*, 1991; Mijares *et al*, 1996; Chiale *et al* 1994; Wallukat *et al*, 1995), relacionándolos con el desarrollo de la patología cardiaca. La interpretación cambiante de la patogenia de la miocardiopatía crónica de la ECh está relacionada con la evolución de la tecnología y la era de la biología molecular a partir de los años 90 (Laguens *et al* 2015) y es por eso que no se descarta la participación de los dos componentes parásito y huésped.

La detección de los anticuerpos  $\beta 1$  adrenérgicos podría tener valor clínico como marcadores de morbilidad; pero para esto se debe realizar una debida estandarización y valides de la prueba a usar en cada grupo de laboratorio donde se desee realizar esta prueba.

Hasta el momento la prueba por excelencia para la detección de estos anticuerpos ha sido la técnica ELISA, la cual generalmente tiene alta sensibilidad, especificidad y reproducibilidad (Ochoa, 2012). La estandarización y validez de la prueba se hace necesaria para garantizar la obtención de resultados confiables para la toma de decisión sobre el avance de una patología cardiaca en un grupo de pacientes, por lo tanto el objetivo del presente estudio fue realizar la estandarización de la prueba de inmunoensayo enzimático ELISA con el péptido sintético de la segunda asa extracelular del receptor  $\beta 1$  adrenérgico humano para la detección de los anticuerpos anti- $\beta 1$  adrenérgicos en pacientes con ECh.

## Materiales y métodos

### Péptido

Los péptidos fueron sintetizados en el laboratorio de Síntesis de péptidos del Instituto de Medicina Tropical por el método de fase sólida (F-moc) descrito por (Merrifield, 1963). Los péptidos corresponden a la secuencia de aminoácidos de la segunda asa extracelular del receptor  $\beta 1$  adrenérgico humano (Mijares *et al.*, 1996), cuya secuencia fue confirmada por espectrometría de masas en Acuapeptide síntesis, núcleo de Biotecnología (NBC), Chile.

### Estandarización

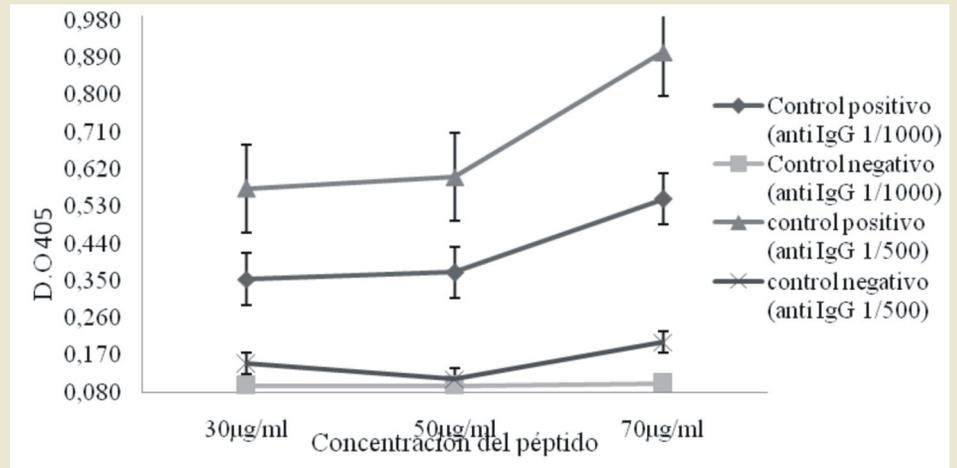
Se ensayaron concentraciones del péptido (30 $\mu$ g/ml, 50 $\mu$ g/ml y 70  $\mu$ g/ml) incubándose por 18 horas, dilución de los sueros (1/20, 1/50, 1/60), con un tiempo de incubación de 18 horas y dilución del conjugado (anti-IgG humano, acoplado a fosfatasa alcalina), con un tiempo de incubación de 90 min. Los ensayos se realizaron en placas de microtitulación de 96 pozos (maxisort, NUNC®), con sueros previamente diagnosticados por ELISA con antígeno total deslipidizado de *T. cruzi*, por hemaglutinación indirecta, y que presentaran historia clínica de padecimientos cardiacos, escogiéndose 4 sueros positivos: 1 de alta, 2 de media y 1 de baja reactividad, así como también 3 sueros negativos que corresponden a personas sanas sin antecedentes cardiacos y negativos a la ECh.

Para discriminar los sueros positivos de los negativos se determinó el punto de corte, mediante ensayo de 46 personas no cardíopatas sin antecedentes de contacto con triatominos. A partir de las lecturas obtenidas a través de un lector de micro placa ELISA (SpectraTecan) a una densidad óptica (DO) 405 nm, se calculó la media aritmética y la desviación estándar, y se definió el punto de corte como la media más 2 desviaciones estándar.

## Resultados

Se seleccionó como dilución óptima del conjugado aquella que muestra la máxima señal de reacción para cada una de las concentraciones empleadas donde se observó la mayor diferencia entre el suero positivo respecto al suero negativo correspondiente a una dilución del conjugado 1/500. La concentración óptima del péptido corresponde a una concentración de 50  $\mu$ g/ml (figura 1).

Se realizaron tres diluciones de los sueros controles positivos y negativos, en la cual la dilución óptima elegida fue 1/50 correspondiente al punto central de la curva con mayor pendiente, el coeficiente de determinación fue calculado dando un valor del  $R^2 \geq 0,98$  indicando que aproximadamente 98% de variación total de los valores en Y están relacionados con las



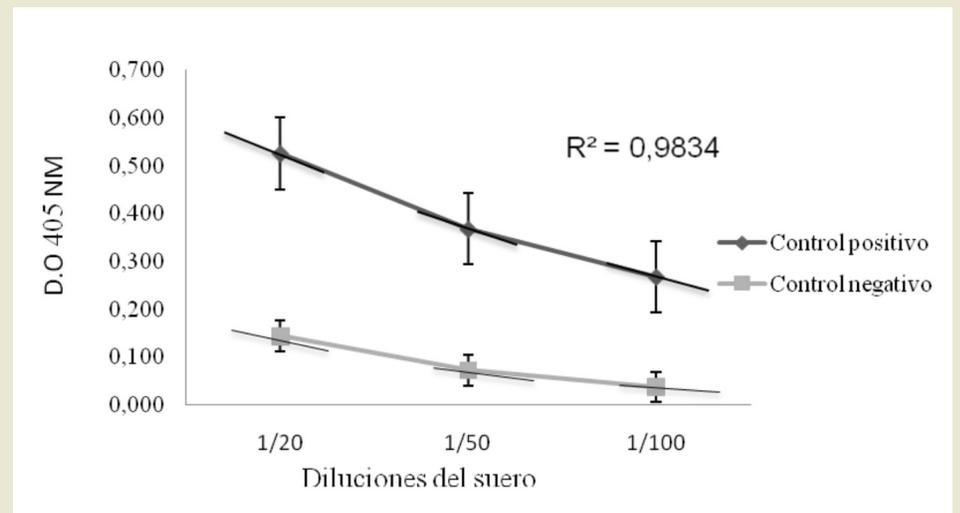
**Figura 1.** Comportamiento de las diferentes concentraciones del antígeno (péptido) frente a una dilución 1/50 de los sueros controles y diluciones del conjugado 1/1000 y 1/500.

variables X (Figura 2).

La estandarización de la prueba se resume en la tabla 1: concentración óptima del antígeno para ELISA fue de 50 µg/ml, dilución del suero 1/50 y del conjugado 1/500. Estas condiciones, se ensayaron con 46 sueros negativos a fin determinar el punto de corte que se fijó en 0,278 nm D.O.

## Discusión

El detección de los anticuerpos  $\beta_1$  adrenérgicos se basa principalmente en pruebas serológicas como el ELISA, una técnica que se caracteriza por su precisión y exactitud, siendo relativamente simple con la ventaja de poder procesarse un número bajo o alto de muestras (Ochoa, 2012), un método relativamente simple que ha permitido establecer la alta prevalencia de estos anticuerpos en diversas enfermedades cardiacas (Goin *et al.*, 1991; Chiale *et al.*, 1996; Gimenez *et al.*, 2002; Talvani *et al.*, 2006; Calzada *et al.*, 2009; Meiller *et al.*, 2003). Existe poca bibliografía que respalde los procesos de estandarización del ELISA para la detección de los anticuerpos  $\beta_1$  son, sin embargo esto no le resta importancia al ensayo debido a su utilidad práctica. Se realizó la estandarización de cada uno de los componentes



**Figura 2.** Evaluación de las diferentes diluciones de suero (1/20, 1/50 y 1/100), con una concentración del péptido de 50 µg/ml y el conjugado diluido 1/500, se muestra la dilución óptima seleccionada (flechas) y el  $R^2 \geq 0,98$  alcanzada.

de la prueba estableciéndose las condiciones adecuadas para la detección de los anticuerpos anti- $\beta 1$  adrenérgicos a través de la técnica ELISA como son establecidas por Ochoa, 2012 y Jacobson, 1998, empleando sueros controles con alta, media y baja reactividad donde se obtuvo como dilución óptima de los sueros 1/50, una concentración del antígeno de 50  $\mu\text{g/ml}$  y del conjugado una dilución de 1/500, valores que coinciden con la metodología empleada por Magnusson *et al.*, 1991.

Trabajos como los de Gimenez *et al.*, 2002; Wallukat *et al.*, 2000 y Calzada *et al.*, 2009 han empleado la prueba ELISA para la detección de IgG específicos anti-receptor  $\beta 1$  adrenérgicos en suero de pacientes con ECh y otras cardiopatías, sin embargo, en ninguno de ellos se definen con claridad las condiciones de cada componente empleado en la técnica ELISA con el péptido  $\beta 1$  adrenérgico.

Al realizar una revisión bibliográfica se observa que trabajos realizados por Chiale *et al.*, 1994; Talvani *et al.*, 2006; Magnusson *et al.*, 1991; Mijares *et al.*, 1996, reportaron en la parte metodológica que emplean diferentes diluciones generalmente de 1/20 a 1/160 del suero de pacientes o animales infectados; pero con el objetivo de evaluar las diferencias entre positivos y negativos mas no para un proceso de estandarización.

Las concentraciones del antígeno empleadas también varían en cada uno de los estudios donde se emplean concentraciones que van de 0,5  $\mu\text{g/ml}$  a 50  $\mu\text{g/ml}$  Vicco *et al.*, 2013; Mijares *et al.*, 1996; Buvall *et al.*, 2005; Talvani *et al.*, 2006; Magnusson *et al.*, 1991; Chiale *et al.*, 1994), lo mismo sucede con el conjugado.

Chiale *et al.*, 1994 sugiere que la validez de la prueba ELISA para la detección de los anticuerpos anti- $\beta 1$  adrenérgico está sustentada por las similitudes en los resultados obtenidos en investigaciones realizadas en pacientes con diversas patologías cardiacas. Holthoff *et al.*, 2012, indica que una alta variación de los porcentajes de estos anticuerpos evaluados en una misma enfermedad pueden deberse a la falta de una adecuada estandarización o si bien, puedan variar dependiendo de las zonas endémicas. Sin embargo, no se han realizado estudios bien diseñados en distintas poblaciones endémicas para demostrar esta hipótesis.

Podemos concluir que las condiciones evaluadas para la estandarización de la prueba ELISA en nuestro laboratorio, como sería la selección de concentración idónea del péptido y dilución óptima del suero y del conjugado resultaron apropiadas para la detección de los anticuerpos anti- $\beta 1$  adrenérgicos en pacientes con Enfermedad de Chagas.

AGRADECIMIENTOS: a la Dra. Maria Angelita Lorenzo por la síntesis del péptido en laboratorio de Síntesis de péptidos del Instituto de Medicina Tropical y a la Dra. Fanny Guzman por la confirmación de la secuencia por espectrometría de masas en el Laboratorio de Biotecnología (NBC), Chile.

## Bibliografía

- BRENER, Z., ANDRADE, Z., NETTO, M. 2000. *Trypanosomacruzi e doença de Chagas*. Editorial GuanabaraKoogan. Segunda edición. Rio de Janeiro.
- BUVALL, L., BOLLANO, E., CHEN, J., SHULTZE, W., FU, M. 2005. Phenotype of early cardiomyopathic changes induced by active immunization of rats with a synthetic peptide corresponding to the second extracellular loop of the human  $\beta 1$ -adrenergic. *ClinExpImmunol*.143: 209-215.

- CALZADA, J., GARISTO, J., ZEBELES, S., SAMUDIO, E., BLANDON, R, AVILÉS, O., SALDAÑA, A. 2009. *Prevalencia de anticuerpos contra receptores autonómicos en pacientes panameños con cardiopatía chagásica crónica y con otras formas de cardiopatía*. Biomédica 29: 133-139.
- CHIALE, P.A., FEIGELSON, E., LEVIN, M., ELIZARI, M., HOEBEKE, J., ROSENBAUM, M. 1994. *Anticuerpos antirreceptores  $\beta$ -adrenérgicos en la enfermedad de Chagas crónica*. Rev Arg Cardiol. 62(1):31-38.
- CHIALE, P.A., VALLAZZA, E., FEIGELSON, E., CARAMES, S., FERRARI, I., LEVIN, M., ELIZARI, M Y COLABORADORES. 1996. *Anticuerpos antirreceptores adrenérgicos beta con actividad agonista parcial en pacientes con cardiopatía eléctrica primaria*. Rev Argent Cardiol. 64 (2): 119-127.
- DUTRA, W., MENEZES, C., VILLANI, F., DA COSTA, G., DA SILVEIRA, A., AVILA, D., GOLLOB, K. 2009. *Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 104(1):208-218.
- GIMENEZ, L., MITELMAN, J., GONZALES, C., BORDA, E., STERIN-BORDA, L. 2002. *Anticuerpos anti receptores autonómicos, alteraciones de la variabilidad de la frecuencia cardíaca y arritmias en sujetos con enfermedad de Chagas*. Rev. Argent. Cardiol. 71:110-113.
- GOIN, J., BORDA, E., SEGOVIA, A., STERIN-BORDA, L. 1991. *Distribution of antibodies against  $\beta$ -adrenoreceptors in the course of the human Trypanosoma cruzi infection*. Exp. Biol. Med. 197:186-192
- HOLTHOFF, H., ZEIBIG, E., JHNAS, V., BAUER, J., LOHSE, M., KAAB, S., CLAUS, S Y COLABORADORES. 2012. *Detection of anti- $\beta$ 1-AR autoantibodies in heart failure by a cell-based competition ELISA*. Circ Res. 111: 675-684.
- MAGNUSSON, Y., WALLUKAT, G., GUILLET, G.J., HJALMARSON, A., HOEBEKE, A. 1991. *Functional Analysis of rabbit anti-peptide antibodies which mimic autoantibodies against the  $\beta$ 1 adrenergic receptor in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy*. Autoimmunity. 4: 893- 905.
- MEILLER, F., SCHMIBERG, J., FERRARI, I., GARRO, H., ELIZARI, M., CHIALE, P. 2003. *Los anticuerpos antirreceptores  $\beta$ -adrenérgicos en el síndrome de taquicardia sinusal inapropiada, ¿un nuevo factor en su fisiopatología?* Rev Argent Cardiol. 71(3): 187-191.
- MERRIFIELD, R, B. 1963. *Solid phase peptide synthesis*. J. Am. Chem. Soc. 85: 2149-2154.
- MIJARES, A., VERDOT, L., PEINEAU, N., VRAY, B., HOEBEKE, J., ARGIBAY, J. 1996. *Antibodies from Trypanosoma cruzi infected mice the second extracellular loop of the  $\beta$ 1 adrenergic and M2 muscarinic receptors and regulate calcium channels in isolated cardiomyocytes*. Moll. Cell. Biol. 163:107-112.

- OCHOA, R. 2012. *Técnicas inmunoenzimáticas para ensayos clínicos de vacunas y estudios inmunoepidemiológicos*. Editorial Finlay. Primera edición. La Habana, Cuba.
- OLIVEIRA, S., PEDROSA, R., NASCIMENTO, J., CARVALHO, A., MASUDA, M. 1997. *Sera from chagasic patients with complex cardiac arrhythmias depreselectrogenesis and conduction in isolated rabbit hearts*. Circulation. 96: 2031-2037.
- OMS/OPS. 2014. *Programa de la OPS/OMS: Enfermedad de Chagas*. [http://www.WHO.int/topics/Chagas\\_disease/es](http://www.WHO.int/topics/Chagas_disease/es) [Consulta: 15/4/2015].
- STERIN-BORDA, L., COSSIO, P. M., GIMENO, M., GIMENO, A. L., DIEZ, C., LAGUENS, R. P, CABEZA, P Y COLABORADORES. 1976. *Effect of chagasic sera on the rat isolated atrial preparation immunological, morphological and functional aspects*. Cardiovascular. 10:613-622.
- STORINO, R., MILEI, J. 1994. *Enfermedad de Chagas*. Editorial Mosby-Doyma. Argentina, Buenos Aires.
- TALVANI, A., ROCHA, M., RIBEIRO, A., BORDA, E., STERIN-BORDA, L., TEIXEIRA, M. 2006. *Levels of anti-M2 and anti- $\beta$ 1 autoantibodies do not correlate with the degree of heart dysfunction in Chagas heart disease*. Microbes and infection.8: 2459-2464.
- WALLUKAT, G., WOLLENBERGER, A., MORWINSKI, R., PITSCHNER, HF. 1995. *Anti-beta 1-adrenoceptor autoantibodies with chronotropic activity from the serum of patients with dilated cardiomyopathy: mapping of epitopes in the first and second extracellular loops*. J. Mol. Cell. Cardiol. 27(1):397-406
- WALLUKAT, G., NISSEN, E., MORWINSKI, R., MULLER, J. 2000. *Autoantibodies against beta and muscarinic receptors in cardiomyopathy*. Herz. 3: 261-266
- VICCO, M., FERINI, F., RODELES, L., CARDONA, P., BONTEMPI, I., LIOI, S., BELOSCAR, J. y COLABORADORES. 2013. *Valoración de anticuerpos con reactividad cruzada patógeno-huésped en pacientes con diferentes estadios de cardiomiopatía chagásica crónica*. Rev Esp Cardiol. 66 (10): 791-796.
- VIOTTI R Y VIGLIANO CA. 2015. Capítulo 10 *Presentacion clínica y etapas*. En "Enfermedad de Chagas: un enfoque practico basado en la investigación médica" Editorial Médica Panamericana Buenos Aires. 129-139
- LAGUENS R, CABEZA-MECKERT, VIGLIANO CA 2015. Capitulo 7 *Patogenia*. En "Enfermedad de Chagas: un enfoque práctico basado en la investigación medica". Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. 81-102