



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGIA



Biomarcadores de evolución en pacientes con Enfermedad de Chagas: Prevalencia de anticuerpos anti-receptores $\beta 1$ adrenérgicos

Trabajo Especial de Grado

Presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela, por la bachiller Márquez Eglys como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Biología.

Tutor(a): Dra Belkisyolé Alarcón de Noya

Asesora Académica: Prof Elizabeth Valdivieso

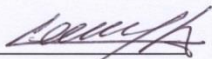
CARACAS, VENEZUELA

NOVIEMBRE, 2015

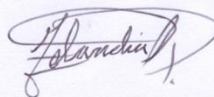
ACTA

Quienes suscribimos, miembros del jurado evaluador designado por el Consejo de Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela para examinar el Trabajo especial de Grado del (la) bachiller Eglys G. Márquez C., CI: 19.930.750, para optar al título de Licenciado (a) en Biología, mención Biología Celular, titulado: **“Biomarcadores de evolución en pacientes con Enfermedad de Chagas: Prevalencia de anticuerpos anti-receptores $\beta 1$ adrenérgicos”**. Consideramos que dicho trabajo reúne los requisitos exigidos por los reglamentos respectivos y por lo tanto declaramos **APROBADO**.

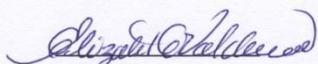
Caracas, 11 de Noviembre de 2015



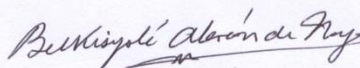
Jurado Principal
Dra. Concepción Hernández



Jurado Principal
Dra. Zelandia Fermín



Asesor (a) Académica
Dra. Elizabeth Valdivieso



Tutor (a)
Dra. Belkisyolé Alarcón de Noya

Agradecimientos

Gracias a mi madre por su amor, trabajo y sacrificio todos estos años y apoyarme incondicionalmente a lo largo de la carrera.

Gracias a mi padre, aquella estrella fantasma en el cielo por haberme enseñado que con esfuerzo, trabajo y constancia todo se consigue y que siempre llevare conmigo el recuerdo de uno de mis amores más grande en mi vida que desde allá me sigue enseñando como enfrentar la vida sin él.

Gracias a la Dra. Zoraida por su constante motivación y apoyo durante la realización de este Trabajo Especial de Grado, siempre enseñándome a expandir mi conocimiento y de superarme cada día y de siempre ir por la constante mejora y ante todo por enseñarme lo importante de tener paciencia.

Un agradecimiento a cada miembro de la Sección de Inmunología por aquellos días llenos de risas y trabajo constante que son reflejo y ejemplo de un grupo unido y trabajador.

Agradezco a la Dra. Belkisyolé Alarcón de Noya por su orientación y apoyo durante la realización de este Trabajo Especial de Grado y darme la oportunidad de fortalecer mis conocimientos en el ámbito científico.

Por último, quiero agradecer a todas las personas que me apoyaron y creyeron en mí y en la realización de este trabajo.

Índice General

	Pág.
Resumen	9
Introducción	10
1. Generalidades de <i>T. cruzi</i>	11
1.1. Distribución geográfica	11
1.2. Epidemiología.....	12
1.3. Taxonomía y morfología.....	14
1.4. Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i>	16
1.5. Reservorios.....	18
1.6. Mecanismos de Transmisión.....	19
1.7. Fases clínicas de la enfermedad.....	20
1.8. Patogenia y patología.....	22
1.9. Mecanismos Fisiopatológicos determinantes del daño miocárdico.....	25
1.9.1 Efectos de <i>T. cruzi</i> en la fisiología de las células cardíacas.....	25
1.9.2 Mecanismos de Autoinmunidad.....	25
1.9.3 Auto-anticuerpos β 1 adrenérgicos implicados en la cardiomiopatía chagásica.....	27
2. Planteamiento del problema y justificación	31
3. Antecedentes	34
4. Objetivos	37
5. Materiales y métodos	38
6. Resultados	43

7. Discusión.....	60
8. Conclusión.....	68
9 Referencias bibliográficas.....	69
10. Anexo.....	78

Índice de Tablas

Tabla 1. Método de cálculo de cada indicador de validación utilizando tabla de contingencia.....	40
Tabla 2. Concentración y diluciones óptimas del suero y conjugado seleccionadas para realizar la prueba ELISA	45
Tabla 3. Valores obtenidos en la estandarización del ELISA.....	45
Tabla 4. Indicadores de validación de la prueba ELISA para detectar anticuerpos anti- β 1 adrenérgico con sueros de referencia.....	46
Tabla 5. Porcentaje de prevalencia de anticuerpos anti- β 1 adrenérgico en distintas fases de la enfermedad y en el grupo control.....	49
Tabla 6. Prueba estadística t-Student para datos no paramétricos.....	50
Tabla 7. Condiciones por las cuales los pacientes fueron divididos en cuatro grupos de acuerdo a la presencia o no de anticuerpos presentes en los años 2008 y 2014.....	55

Índice de Figuras

Figura 1. Mecanismos de invasión de <i>T. cruzi</i>	17
Figura 2. Ciclo de vida del <i>T. cruzi</i>	18
Figura 3. Estructura molecular del receptor $\beta 1$ adrenérgico humano.....	28
Figura 4. Esquema metodológico de la estandarización del Inmunoensayo enzimático ELISA.....	41
Figura 5. Comportamiento de las diferentes concentraciones del antígeno frente a una dilución 1/50 de los sueros controles y diluciones del conjugado.....	44
Figura 6. Evaluación de las diferentes diluciones de suero, con una concentración del péptido de 50 $\mu\text{g/ml}$	44
Figura 7. Inmunoreactividad de los sueros con el péptido $\beta 1$ adrenérgico en la prueba ELISA.....	47
Figura 8. Inmunoreactividad de los sueros con el péptido $\beta 1$ adrenérgico en la prueba ELISA y su prevalencia según la evolución clínica de pacientes con Enfermedad de Chagas	48
Figura 9. Cinética de aparición de anticuerpos anti- $\beta 1$ adrenérgicos durante la evolución de la Enfermedad de Chagas de un grupo de pacientes inicialmente en fase aguda.....	51
Figura 10. Frecuencia de aparición de anticuerpos anti- $\beta 1$ adrenérgicos durante la evolución de 36 pacientes seleccionados.....	52
Figura 11. Prevalencia de anticuerpos anti- $\beta 1$ adrenérgicos durante la evolución en pacientes menores de 15 años del brote oral de Chacao 2007.....	53
Figura 12. Prevalencia de anticuerpos anti- $\beta 1$ adrenérgicos durante la evolución en pacientes mayores de 15 años del brote oral de Chacao.....	54
Figura 13. Gráfico de dispersión del Grupo 1 negativos en pre-tratamiento y positivos post-tratamiento.....	56
Figura 14. Gráfico de dispersión del Grupo 2 negativos en pre-tratamiento y post-tratamiento.....	57

Figura 15. Gráfico de dispersión del Grupo 3 positivos pre-tratamiento y negativos post-tratamiento..... 58

Figura 16. Gráfico de dispersión del Grupo 4 positivos pre-tratamiento y post-tratamiento..... 59

RESUMEN

La Enfermedad de Chagas (ECh) causada por el agente etiológico *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), es la principal causa de cardiomiopatía crónica en América Latina. La presencia de anticuerpos contra receptores $\beta 1$ adrenérgicos en pacientes con ECh y otras cardiopatías pueden contribuir con la progresión del daño miocárdico, por ende, la detección temprana de estos anticuerpos en los pacientes podría ser indicativo de la prematura instalación de un daño cardíaco. Este trabajo tiene por objetivo principal establecer la frecuencia de anticuerpos anti-receptores $\beta 1$ adrenérgicos en las distintas fases de la ECh y compararla con cardiopatías de otro origen. Se determinó la prevalencia de auto-anticuerpos contra receptores $\beta 1$ adrenérgicos por medio del ensayo enzimático (ELISA), previamente estandarizado, donde se trabajó con seis grupos de pacientes: 43 pacientes en Fase Aguda, 44 pacientes Crónicos Recientes, 46 pacientes en Fase Indeterminada, 43 pacientes Cardiopatas con ECh, 33 pacientes Cardiopatas sin ECh y 23 pacientes controles. Para el estudio longitudinal se trabajó con 532 muestras de suero de 76 pacientes con ECh del brote de transmisión oral, ocurrido en Chacao. Se detectaron niveles elevados de anticuerpos anti-receptores $\beta 1$ adrenérgico en el grupo de pacientes chagásicos (50%), comparados con el grupo de cardiopatas sin ECh (42%). Al comparar la prevalencia de anticuerpos en las distintas fases de la enfermedad se observó un porcentaje elevado en la fase aguda (86%), fase indeterminada (41%) y crónicos cardiopatas con ECh (47%), observándose el mismo comportamiento en el estudio longitudinal. La alta prevalencia de estos anticuerpos en fases tempranas de la enfermedad y posteriormente en la fase indeterminada y en pacientes con cardiomiopatías crónicas, indicarían el desarrollo de un trastorno inmunoregulatorio que podría involucrar a los receptores $\beta 1$ adrenérgicos y cuya estimulación sostenida intervendría en los mecanismos fisiopatológicos de las enfermedad cardíaca.

PALABRAS CLAVE: Enfermedad de Chagas, Cardiomiopatía Chagásica crónica, Anticuerpos, Receptores $\beta 1$ adrenérgicos.

INTRODUCCION

La Enfermedad de Chagas (ECh) o tripanosomiasis americana es una infección producida por *Tripanosoma cruzi*, un parásito intracelular obligatorio transmitido a través de triatominos, insectos hematófagos, que pueden compartir la vivienda con el hombre y mamíferos domésticos y silvestres (WHO, 2002). Esta parasitosis es endémica en América Latina y una zoonosis ampliamente extendida, siendo la cuarta causa de morbilidad y mortalidad en el continente (Storino, 1994).

En 1909 el Dr. Carlos Justiniano Ribeiro Chagas (Oliveira, Minas Gerais, 09/07/1879 Rio de Janeiro 8/11/1934), se encontraba en la ciudad de Belem en el Amazonas, Brasil, combatiendo una epidemia de paludismo en trabajadores de una línea nueva del ferrocarril, pensando que los chipos (chinchas,vinchucas) por ser hematófagos podrían transmitir distintas enfermedades, este examinó el contenido intestinal de estos triatominos (*Panstrongylus megistus*) descubriendo el protozooario *Schizotrypanum cruzi*, rebautizado posteriormente como *Trypanosoma cruzi* (en honor a su maestro y amigo Oswaldo Cruz). Posteriormente realizó una prueba donde el insecto picara a un mono, detectando luego la presencia del parásito en la sangre del mismo, poco tiempo después (23 de abril 1909), el Dr. Ribeiro encontró *T. cruzi* en la sangre de una niña de dos años llamada “Berenice” quien presentó hinchazón de la cara, fiebre elevada, crecimiento del hígado, bazo y ganglios linfáticos, reportando así el primer caso humano agudo de la ECh (Beaver y col, 2003; Becerril, 2008; Dias, 2000).

La tripanosomiasis americana es considerada una infección originaria del neotrópico y una de las cinco principales enfermedades tropicales que afligen a la región, donde la enfermedad no es un problema epidemiológico aislado, ya que en áreas endémicas está estrechamente asociada con enfermedades típicas de la pobreza llamadas “sociales” tales como: malnutrición, diarrea, tuberculosis y otras enfermedades parasitarias (Storino, 2000).

Las manifestaciones y características epidemiológicas de la parasitosis varían de un área endémica a otra y las tasas de prevalencia, características del parásito, patología, clínica, vectores y reservorios difieren ampliamente (WHO, 2002).

La mayoría de las veces esta enfermedad pasa inadvertida en forma asintomática hasta que sobrevienen las alteraciones cardíacas. Clínicamente se reconocen tres etapas. Una inicial o fase aguda, cuyos síntomas pueden ser leves y poco característicos, por este motivo sólo se logra detectar en pocos pacientes. Las manifestaciones clínicas generales en esta fase incluyen la aparición del chagoma de inoculación, edema bipalpebral (generalmente unilateral, signo de Romaña), fiebre, adenopatías, edemas y en muy pocos casos miocardiopatía. Luego, pasa por un curso silencioso e inaparente (fase crónica asintomática) que se inicia de 8 a 10 semanas después de la fase aguda y puede durar meses o años, antes de evolucionar poco a poco a una etapa crónica asintomática prolongada durante la cual, la mayoría desarrollará una cardiopatía crónica ó alteraciones crónicas digestivas y neurológicas (Ribeiro, 2012; Rastrepo, 1998).

El curso fisiopatológico de la ECh transcurre lentamente, por una fase inicial puramente agresiva parasitaria e inflamatoria a la cual le sigue una larga trayectoria inmunológica en parte auto-agresiva. Ambas fases se entrecruzan y la duración e intensidad de las mismas dependerá de múltiples factores asociados tanto al parásito en sí, como al hospedador (Storino, 2002)

1. Generalidades de *T. cruzi*.

1.1 Distribución Geográfica

La (ECh) es una infección endémica del continente Americano que ha evolucionado de su forma enzoótica primitiva a una antropozoonosis. Su distribución geográfica se extiende desde el paralelo 40° de latitud norte en el sur de Estados Unidos, hasta el paralelo 45° de latitud sur en Argentina y Chile. El área de prevalencia se superpone con el área de distribución geográfica de los vectores triatominos, afectando sobre todo a las poblaciones rurales que habitan en viviendas deficientes. Sin embargo en las dos últimas décadas, la transmisión del parásito a humanos ha disminuido por efectivos programas de control en zonas endémicas. No obstante, la ECh sigue siendo la tercera enfermedad parasitaria más importante en el mundo, tras el paludismo y la esquistosomiasis (Pinto, 2008; Storino, 1994).

El flujo migratorio desde América Latina ha originado cambios sustanciales en la epidemiología de la ECh, debido a su propagación a zonas no endémicas, como Estados Unidos y países Europeos. Adicionalmente, el escaso conocimiento sobre la enfermedad, origina fallas en los procesos de control, especialmente en los bancos de sangre (OMS, 2008).

1.2 Epidemiología

La ECh constituye un grave problema de salud en casi todo el continente americano encontrándose en 21 países americanos. En 1960 un grupo de expertos de la O.M.S estimó la existencia de al menos 7 millones de personas infectadas y cerca de 35 millones las personas bajo riesgo de contraer la infección. Para esa misma fecha el número de infectados en Venezuela era aproximadamente de 1,5 millones. Actualmente se estima cerca de 100 millones de personas en riesgo de contraer la infección, de 7 a 8 millones de personas infectadas, con 56.000 nuevos casos anuales por todas las formas de transmisión. Si bien la enfermedad se encuentra en casi toda América Central y del Sur, sus manifestaciones y características epidemiológicas son variables entre una y otra zona endémica (OMS/OPS, 2014).

En los últimos años se ha observado un claro descenso del número de pacientes infectados en áreas endémicas del continente americano, donde se estima una disminución en la incidencia de nuevos casos de infección. Como se puede observar por los datos reportados, bajo de 700.000 casos anuales en 1990 a 41.200 casos en el 2006, esto debido a las medidas de control tomadas por distintos países como: Uruguay, Chile, Brasil, Guatemala, Honduras y El Salvador que presentan una variedad de programas para la eliminación de *Rhodnius prolixus* y *Triatoma dimidiata* e interrupción de la transmisión (Pinto, 2008).

En Venezuela en los últimos años la ECh se ha extendido a distintas poblaciones humanas ubicadas en las diferentes regiones localizadas desde el extremo occidental hasta las entidades localizadas en el extremo oriental del país (Añez y col, 2003).

Estudios epidemiológicos destacan la existencia de factores de riesgo que facilitan la infección de los insectos transmisores y el contacto de estos con el hombre. La falta de higiene, la constante presencia de animales domésticos susceptibles a esta enfermedad y la carencia de conocimiento sobre la enfermedad, pudieran estar condicionando la transmisión en ciertas regiones (Añez y col, 2003; Suárez, 2004; Becerril, 2008).

En el año 2003, Añez y colaboradores reportan la seroprevalencia ante la infección por *T. cruzi* en 75 localidades pertenecientes a 11 Estados de Venezuela consideradas zonas endémicas, entre ellas: Anzoátegui, Apure, Barinas, Cojedes, Falcón, Monagas, Lara, Mérida, Portuguesa, Trujillo y Yaracuy. Evaluando a 3.993 pacientes, donde el primer grupo examinado de 310 personas resultaron 54,2 % seropositivos a *T. cruzi* en todos los grupos de edades, detectando 44,6% de casos agudos, 11,9% en fase indeterminada y 43,5 % en fase crónica. Con respecto a la colecta e identificación de los triatominos, identificaron 5 especies, entre ellas: *Rhodnius prolixus*, *R. robustus*, *Eratyrus mucronatus*, *Triatoma maculata* y *T. nigromaculata*.

Traviezo y Bofante-Garrido (2004), en un estudio realizado en la localidad de Caballito en el Estado Lara, reportaron 54,54% de individuos seropositivos a *T. cruzi* en 281 individuos evaluados. Así mismo recolectaron 106 ejemplares de *Rhodnius prolixus*, de los cuales 30,2% se encontraban infectados.

De igual manera, en otra localidad del Estado Lara, específicamente en el municipio Andrés Eloy Blanco, zona endémica para la enfermedad y reconocida por presentar el nivel más elevado de pobreza del Estado, Bofante y colaboradores (2007), analizaron 869 muestras detectando una prevalencia de infección de 6,9 %. Recolectaron 143 triatominos, 138 pertenecientes a la especie *P. geniculatus* y 5 pertenecientes a *R. prolixus*.

En diciembre del año 2007, se reportó en la ciudad de Caracas, el brote agudo más numeroso de ECh por transmisión oral en el mundo, donde estuvieron involucrados maestros y niños de una escuela (Alarcón de Noya y col. 2010).

Añez y colaboradores (2011), publicaron por primera vez la presencia de infecciones inaparentes en una comunidad Yukpa en la Sierra de Perijá en el occidente de Venezuela. De 173 muestras de suero 13, 9% fueron seropositivo a *T. cruzi*. De igual manera de 8 muestras de sangre de perros encontrados en los alrededores de la comunidad, resultaron seropositivos al antígeno *T. cruzi*, indicando el papel que presentan estos mamíferos en la circulación del parásito en dicha comunidad.

Añez y colaboradores (2013), estudiaron desde el punto de vista clínico, epidemiológico, sero-parasitológico y molecular un posible brote agudo de ECh por transmisión oral en Mérida, la familia estaba constituida por cinco miembros que compartían el mismo espacio en una vivienda rural, en la cual se observó la permanencia de animales porcinos y bovinos.

1.3 Taxonomía y Morfología

T. cruzi es un parásito flagelado incluido en el phylum *Sarcomastigophora*, clase *Mastigophora*, orden *Kinetoplastida*, que comprende a organismos con uno o más flagelos y una mitocondria que contiene ADN en una porción diferenciada como organela llamado Kinetoplasto, situado en la base del flagelo. Pertenece a la familia de los trypanosomatidae, género *Trypanosoma* y subgénero *Schizotrypanum*, para designar a los tripanosomas que se multiplican en el interior celular en el vertebrado. Posee un ciclo de vida complejo que incluye tres formas morfológicas (amastigotes, epimastigotes y tripomastigotes metacíclicos y sanguíneos) comprendidas en dos hospedadores: el vector invertebrado y el hospedador mamífero (Hoare, 1971; Brener, 2000).

Durante el ciclo de vida, este flagelado pasa por cambios morfológicos y funcionales relacionados con sus hospedadores; epimastigote y amastigote formas replicativa del parásito y tripomastigote metacíclico y sanguíneo que corresponderían a la formas infectantes del mismo (Brener, 2000).

Epimastigote: Es de aspecto fusiforme y alcanza a medir hasta 25 μm de largo, su extremidad posterior es gruesa y posee un núcleo central y redondo. Presenta un flagelo que emerge lateralmente. Posee un kinetoplasto ubicado por delante o a un lado del núcleo, lo cual lo diferencia de los tripomastigote.

Este estadio es bastante móvil, presentando una intensa actividad replicativa por división binaria longitudinal, muchas veces forman rosetas (Segovia, 1976). Se encuentra únicamente en el intestino del vector y en medios de cultivos.

Amastigote: Es de forma redonda u ovoide, con medidas de 2 a 3 μm de diámetro, posee un núcleo y un kinetoplasto grande, carece de flagelo externo y membrana ondulante.

Estas formas se multiplican por división binaria en el hospedador vertebrado y pueden observarse en el interior de las células de diversos tejidos, siendo estas las responsables en un inicio de la patología celular (Segovia, 1976).

Tripomastigote sanguícola: Es de aspecto fusiforme, mide entre 15 a 20 μm de largo por 2 a 4 μm de ancho, presenta casi siempre una forma curva en “C” o “S”, posee un citoplasma granuloso finamente alveolar y un núcleo redondo, tiene un kinetoplasto situado detrás del núcleo, así como una membrana ondulante a lo largo del organismo.

El tripomastigote sanguícola se encuentra libre en la circulación sanguínea del hombre y de un gran número de mamíferos, constituyéndose en la forma infectante para el vector triatomino (Segovia, 1976) e infecta células del hospedador.

Tripomastigote metacíclicos: Conserva las mismas características que el tripomastigote sanguícola, se encuentra ubicado en la porción final del tracto digestivo del vector (ampolla rectal) y es la forma infectante para el hombre y la gran mayoría de mamíferos (Segovia, 1976).

1.4. CICLO BIOLÓGICO del *Trypanosoma cruzi*

El vector se infecta al ingerir sangre de un hospedador vertebrado infectado con tripomastigotes sanguícolas circulantes. En pocos días el tripomastigote ingerido se transforma en el estómago del vector en epimastigote. Los epimastigotes migran al intestino, donde comienzan a dividirse intensamente. En la región posterior, muchos epimastigotes se liberan de la superficie del intestino y se transforman en tripomastigotes metacíclicos los cuales son expulsados junto con las heces (De Souza, 2010).

Los triatomíneos infectados, al picar nuevamente a un hospedador vertebrado y después de una ingesta abundante de sangre, defecan sobre la superficie. Usualmente la infección del vertebrado se lleva a cabo a través de la inoculación directa de las formas infectantes en la mucosa ocular o en lesiones de la piel provocadas por la picada del insecto al momento de alimentarse. (Becerril, 2008; De Souza, 2010).

Los tripomastigotes metacíclicos al ingresar al torrente sanguíneo del hospedador pueden invadir diversas células (macrófagos, fibroblastos y células epiteliales), a través, de varios mecanismos, de los cuales se puede mencionar: 1) Endocitosis, donde participan los filamentos de actina 2) Mecanismos dependiente de Lisosomas, que involucra un aumento de los niveles de calcio en el citoplasma inducido por el parásito que reclutara lisosomas al lugar de invasión y 3) Mecanismo independiente de Lisosomas, el parásito entra por la membrana plasmática por la acumulación de PIP₃. Ya en el interior celular se produce el ensamblaje de una vacuola parasitófora donde se sugiere que el parásito regula cada componente de la misma (Calvet, 2012; De Souza, 2010) (Figura 1).

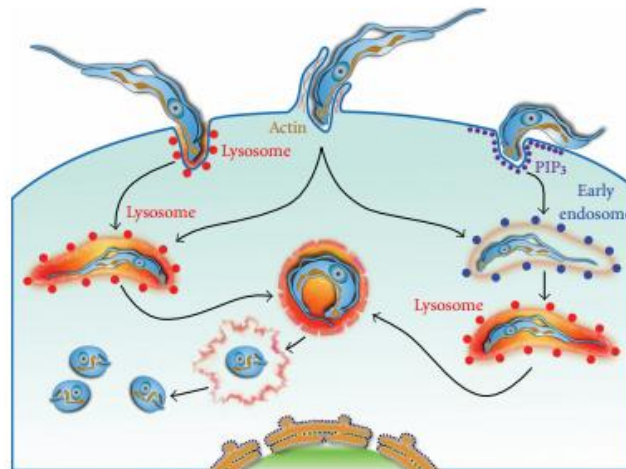


Figura 1. Mecanismos de invasión de *T. cruzi*. Se muestran los tres mecanismos de invasión del parásito 1) Endocitosis con participación de los filamentos de actina, 2) Lisosomas dependientes, es iniciado por un aumento de Ca^{2+} intracelular y 3) lisosomas independientes, el parásito entra por una invaginación de la membrana plasmática debido a la acumulación de PIP_3 (imagen tomada de Souza, 2010).

Más tarde los tripomastigotes se transforman gradualmente en amastigotes con la simultánea lisis de la vacuola. Los amastigotes entran en contacto directo con el citoplasma y comienza su división, a partir de ese punto se transforman en tripomastigotes, causando la ruptura de la célula por su continuo movimiento con la consecuente salida de los mismos a la sangre denominándose tripomastigotes sanguícolas (De Souza, 2010; Becerril, 2008) (Figura 2).

Para que la infección se establezca en el hospedador vertebrado, es necesario que existan las condiciones adecuadas y que el parásito logre superar los mecanismos de defensa que proporciona el sistema inmunitario del hospedador antes, durante y después de ingresar el parásito en las células, representando una forma de adaptación biológica para sobrevivir en el medio inmunológicamente hostil del hospedador (Palau, 2000).

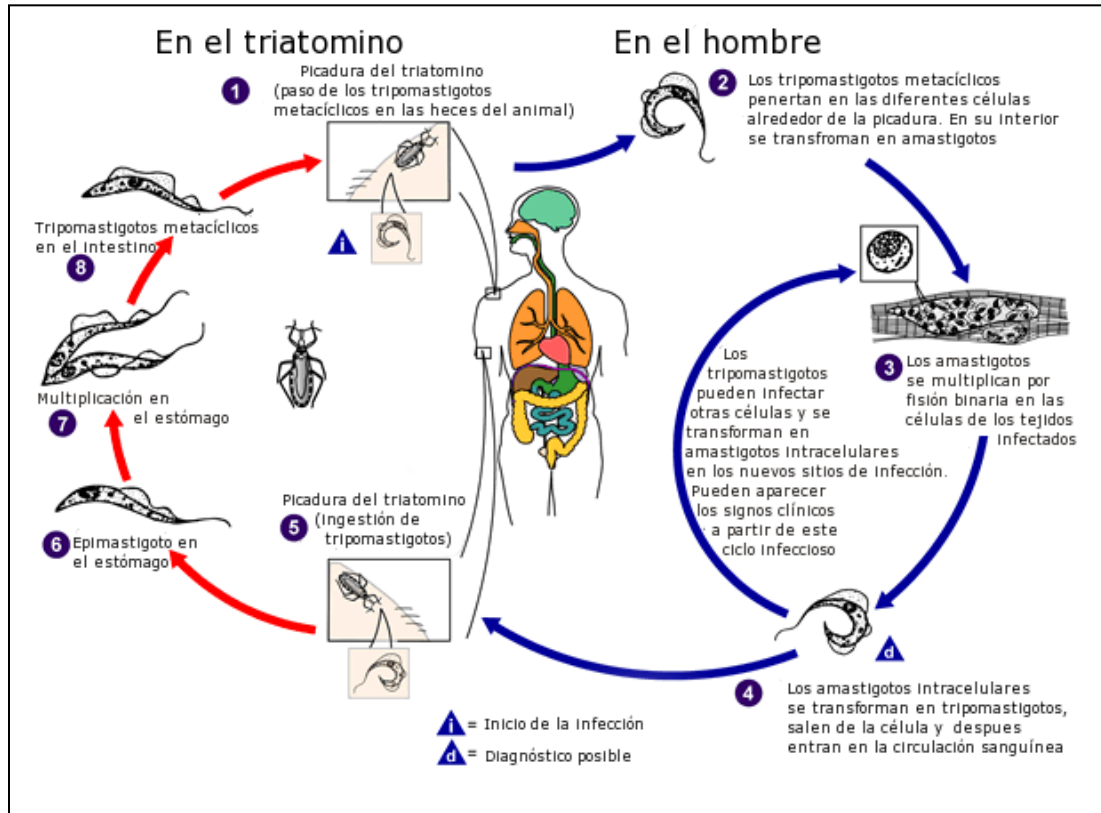


Figura 2. Representación del ciclo de vida del *T. cruzi*

<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/trypanosomiasisAmericana.htm> (consulta 27/11/14)

1.5. RESERVORIO Y VECTORES.

Los vectores invertebrados son los insectos hematófagos de la familia Reduviidae, subfamilia Triatominae, aunque se les conoce por diversos nombres dependiendo de las áreas geográficas donde se encuentren. Estos insectos se caracterizan por tener una probóscide larga y recta para picar y chupar, dos pares de alas y dos antenas insertadas lateralmente en la cabeza (Brener, 2000).

Si bien se han descrito más de 100 especies de triatominos, no todas actúan como vectores. Las especies más importantes capaces de transmitir el parásito al humano son: *Triatoma infestans*, *Triatoma dimidiata*, *Rhodnius prolixus*, *Panstrongylus geniculatus* y *Panstrongylus megistus*. Se reproducen por huevos, pasando por cinco estadios de ninfas antes de llegar al adulto, la frecuencia de alimentación de estos triatominos dependerá de la temperatura, humedad donde se encuentren y especie (Brener, 2000).

En Venezuela el principal transmisor de la enfermedad es *Rhodnius prolixus* y es el responsable del 69% de los casos de transmisión. Como transmisores secundarios se tiene a *Triatoma maculata*, responsable del 30% de las transmisiones y por último *Panstrongylus geniculatus*, donde su presencia en los centros urbanos y adaptación están cambiando la importancia de este insecto como vector de la infección. Esta clasificación se fundamentó en los aspectos relacionados con la epidemiología de la enfermedad (Pifano, 1960; Feliciangeli, 2009).

1.6. MECANISMOS DE TRANSMISION.

En el ser humano la adquisición o transmisión del parásito puede ocurrir por diversas formas:

Vía vectorial: Ocurre por medio de las heces de los triatomíneos al momento de la picadura.

Transfusión de sangre: Este modo de transmisión ha ganado cada vez más relevancia en las zonas urbanas, dado que la transfusión de sangre es un medio terapéutico ampliamente utilizado y además, por fallas en el diagnóstico de la enfermedad en donantes clínicamente sanos. El riesgo de adquirir la enfermedad por esta vía es alrededor del 10 al 20% y depende de múltiples factores (Cerisola, 1972; Rassi, 2010).

Transmisión congénita: La mujer embarazada con parasitemia puede transmitir *T. cruzi* al feto a través de la placenta, sea directamente a través de lesiones de la placenta o mediante la formación de nidos parasitarios en la parte fetal de la placenta, causando así la enfermedad congénita (Recacoechea, 1993).

Oral: La ECh puede contraerse por ingesta de alimentos o bebidas contaminadas con *T. cruzi*. Actualmente se cree que esta vía de transmisión es la más importante y es la causante de la mayoría de los casos en Brasil. Se ha detectado transmisión oral en otros países como Venezuela, Colombia, Argentina y Ecuador (Toso, 2011; Alarcón de Noya, 2010; Dias, 2006).

1.7. FASES CLINICAS DE LA ENFERMEDAD

Clínicamente se conocen dos etapas de la enfermedad. La inicial o aguda de corta duración seguida por una etapa crónica que se divide en una fase crónica indeterminada o asintomática, para luego entrar a una crónica con manifestaciones clínicas evidentes.

El periodo de incubación de la ECh puede variar de acuerdo con la forma de transmisión, que pueden ser de forma directa por transfusión (30 a 40 días), oral (3 a 22 días), congénita y por trasplante de órganos ó de forma indirecta por el contacto con el material de las deyecciones del vector que tiene un periodo de incubación de 3 a 4 días (Rastrepo, 1998; OPS, 2009)

Pasado este tiempo, el individuo puede o no desarrollar la sintomatología característica de la fase aguda y, posterior a un periodo de latencia, desarrollar la fase crónica de la enfermedad.

Fase aguda: Suele comenzar entre 4 a 10 días de la infección, siendo asintomática en 90% de la población infectada. Durante esta fase cuando ocurre el contacto directo con el vector, se puede observar el “síndrome de puerta de entrada” por donde penetran los tripanosomas, apareciendo un nódulo inflamatorio. Cuando la penetración es a nivel de la conjuntiva, se observa el complejo oftalmo-ganglionar, conocido como signo de Romaña, que es un edema bpalpebral , acompañado en algunos casos de edema facial (Rastrepo, 1998).

De manera general, la enfermedad cursa con una sintomatología inespecífica, pudiendo aparecer fiebre, presentándose en 95% de los casos de forma continua, remitente e intermitente. Aproximadamente en 10% de los casos se puede presentar miocarditis aguda y/o meningoencefalitis aguda (Storino, 1994; MPPS, 2007).

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad contraída por vía oral son distintas a las observadas por la forma tradicional, puede presentarse fiebre alta y prolongada, cefalea, decaimiento y en menor grado dolor abdominal, de igual forma puede causar miocardiopatía aguda y particularmente puede generar alta mortalidad en pacientes de menor edad (Rassi, 2010; Alarcón de Noya y colaboradores, 2010).

Fase crónica indeterminada: Se puede encontrar en individuos que pasaron una fase aguda en forma asintomática o con pocas manifestaciones clínicas. Estas personas están infectadas, sus exámenes serológicos son positivos pero no existe una cardiopatía clínica comprobable.

Existe una disminución progresiva de la parasitemia y un incremento concomitante de la respuesta inmunitaria. Sin embargo alrededor de 25% a 30 % de los individuos desarrollan en un lapso de 10 a 20 años la miocardiopatía crónica. El resto permanece en esta fase durante toda su vida (Storino, 1994). Representando un ejemplo de adaptación entre el hospedador y el parásito en estos casos, lo cual tiene sentido ya que la mayoría de los individuos permanecen asintomáticos y mueren ya a una edad avanzada por causas no relacionadas con la enfermedad.

Las causas reales por las cuales un individuo puede evolucionar o no hacia una cardiopatía son variadas, Sin embargo a través del análisis comparativo de distintos pacientes con ECh se ha logrado inferir que existen diversos factores que condicionarán con una mayor probabilidad a un porcentaje de la población infectada hacia la fase crónica cardíaca, entre ellas: la predisposición genética del hospedador, lesiones producidas por el parásito y sistema inmunitario. (Dutra y colaboradores, 2009).

Fase Crónica: Esta etapa se caracteriza por alteraciones definitivas e irreversibles a nivel del sistema nervioso, corazón y/o aparato digestivo. El compromiso cardíaco puede ocurrir muchos años después de haber tenido la infección primaria (Acquatella, 2000; Storino, 1994).

Desde el punto de vista clínico el paciente con miocardiopatía chagásica crónica puede presentar síntomas aislados. Los síntomas más comunes son palpitaciones, disnea de grado variable, dolor, mareos hasta alcanzar un cuadro de descompensación cardíaca (Storino, 1994).

1.8. PATOGENIA Y PATOLOGIA

Las alteraciones que se van a producir en los distintos órganos afectados por el parásito en la evolución natural de la enfermedad dependerán de múltiples factores, tales como: persistencia del parásito, virulencia de las cepas de *T. cruzi*, respuesta inmunitaria del hospedador, cantidad de inoculación y de la existencia de patologías asociadas y sobreagregadas (Storino, 1994).

Entiéndase como patogenia la secuencia de sucesos celulares y tisulares desencadenados por la acción de un agente etiológico hasta la manifestación de la enfermedad. No debe confundirse aunque guardan estrecha relación con la fisiopatología, que son aquellas alteraciones producidas en el organismo a consecuencia de la enfermedad (Mendoza, 2004).

Los estadios evolutivos de la ECh se dividen en dos etapas, una fase inicial o aguda y una fase crónica.

En la fase inicial una vez que el parásito penetra a las células circundantes al sitio de la infección, y completan uno o varios ciclos de replicación intracelular, pasan al torrente sanguíneo donde pueden invadir otras células del hospedador (teniendo preferencia por el músculo cardíaco), produciendo la destrucción de las células, causando posteriormente una reacción inflamatoria con infiltrado donde predominan macrófagos, linfocitos, neutrófilos y eosinófilos. A consecuencia de la reacción inflamatoria se producen alteraciones de las fibras musculares y, en grado variable daños en las neuronas de los ganglios parasimpáticos. En la fase aguda, el parásito induce un estado de inmunosupresión inespecífica que le permite al mismo invadir las células y diseminarse, prolongando la permanencia del parásito en los tejidos debido a que su eliminación no es completa (Becerril, 2008; Rastrepo, 1998 y Tarleton, 1991).

El estado de inmunosupresión que ocurre en esta fase ha sido comprobado en modelos experimentales, en los cuales se observan altos niveles de citoquinas proinflamatorias (IFN- γ y TNF- α) con deficiencia de IL2, que a su vez explica la baja respuesta proliferativa de los linfocitos T. Se sabe que en este punto se activan células del sistema inmune como los macrófagos que presentan una actividad microbicida, con la

inducción de NO con potentes efectos oxidantes y citotóxicos. Altas concentraciones de NO pueden provocar un daño a nivel local por el estrés oxidativo, afectando la proliferación de células T (Abrahamsohn, 1995; Brener, 2000).

La fase crónica se caracteriza por una disminución de la parasitemia y lesiones típicas en el corazón y tubo digestivo. Durante esta etapa la patología más importante es la miocarditis cuya fisiopatología es más compleja y no parece depender solo de la presencia del parásito (Becerril, 2008). Se han establecido diversas hipótesis explicativas del avance de este padecimiento tan complicado y que han sido discutidas por múltiples investigadores en las últimas décadas, entre ellas se encuentran:

1) Daño directo del parásito: Durante la fase aguda de la enfermedad las lesiones inflamatorias son atribuibles a la acción directa del parásito, el cual se multiplica rápidamente dentro de las fibras miocárdicas, produciendo daño miocítico acompañado de un infiltrado inflamatorio donde predominan células efectoras del sistema inmune, evolucionando a una intensa fibrosis y conduciendo a la insuficiencia funcional del corazón. Todo parece indicar que la persistencia del parásito y la respuesta inmunitaria que este causa desempeña un papel clave en la patogenia de la enfermedad. Numerosas evidencias respaldan este mecanismo, ya que métodos más sensibles como la inmunohistoquímica y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), han demostrado una clara correlación de los antígenos de *T. cruzi* o el ADN del parásito con las alteraciones inflamatorias de las lesiones crónicas (Neto-Marin, 2009; Brener, 2000; Acquatella, 2000).

2) Teoría autoinmunitaria: Se estima que el daño cardiaco es consecuencia de una regulación defectuosa de la respuesta inmunitaria más que el resultado de la acción del agente etiológico, por ello, se ha estipulado la teoría de una miocarditis autoinmune que ocurre como consecuencia de una auto-reactividad innata y adaptativa contra antígenos propios del organismo que se explicara en detalle más adelante (Brener, 2000).

3) Teoría neurogénica: Estudios anatomopatológicos han demostrado una disminución masiva de células neuronales producido por el parásito de forma irreversible, que ocasiona una regulación anormal del sistema autónomo, como consecuencia los pacientes carecen de la acción inhibitoria tónica que ejerce el sistema parasimpático sobre el nodo sinusal y en otras regiones miocárdicas. Un desequilibrio a largo plazo daría lugar a una miocardiopatía inducida por catecolaminas logrando desencadenar arritmias malignas y muerte súbita (Neto-Marin, 2009).

Alteraciones en el sistema nervioso autónomo, como por ejemplo ganglionitis, periganglionitis y neuritis se presentan durante la infección con *T. cruzi* en modelos animales y pacientes infectados. En pacientes con ECh se observó una interrupción del sistema de conducción a células cardíacas, ocurriendo esta condición en paralelo con el proceso inflamatorio de la miocarditis en fase aguda, durante la cual ha sido observada una recuperación gradual tanto del sistema nervioso como del tejido del corazón (Ribeiro, 2012).

Dias da Silva y colaboradores (2003), demostraron una correlación positiva entre la intensidad de miocarditis y los niveles de disfunción autónoma cardíaca, en hámsters infectados sugiriendo una relación entre los procesos inflamatorios y la disfunción autónoma vagal cardíaca.

4) Alteraciones microvasculares: La liberación de linfoquinas en fase aguda atrae a macrófagos, se estimula la producción de factor plaquetario que promueve agregación plaquetaria intravascular, observándose una vasculitis con hipertrofias microvasculares, originando isquemia focal (Acquatella, 2000).

Las lesiones cardíacas desde el punto de vista patológico producen un aumento del volumen del corazón pudiendo llegar a cardiomegalias por hipertrofia y/o dilatación de los ventrículos. Las lesiones del tubo digestivo, se traducen en los cuadros de megaesófago y megacolon (Rastrepo, 1998).

1.9. MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS DETERMINANTES DEL DAÑO CARDIACO.

La miocardiopatía chagásica es una miocarditis caracterizada por infiltrado inflamatorio de grado moderado a intenso con predominio de linfocitos y macrófagos, ocasionada por la destrucción progresiva de las células cardíacas parasitadas produciendo una respuesta inflamatoria con fibrosis reparativa que, después de años, e incluso décadas, generan anormalidades de la conducción eléctrica e insuficiencia contráctil.

1.9.1 Efectos del *T. cruzi* en la fisiología de las células cardíacas

Durante la interacción del *T. cruzi* con la célula cardíaca (cardiomiocito), ocurren cambios en la organización del citoesqueleto implicado en los procesos de relajación y contracción del corazón, acompañado de una destrucción de las miofibrillas en las áreas donde se forman nidos de amastigotes. Este trastorno producirá irregularidades en las concentraciones de Ca^{2+} afectando la contractibilidad de la célula. Adicionalmente el parásito ocasiona daños en las uniones gap que juegan un papel importante en la fisiopatología del tejido cardíaco, ya que afectan la integridad del tejido, generando perturbaciones en el sistema de conducción eléctrico, siendo la principal causa de las arritmias observadas tanto en la fase aguda como en la fase crónica de la enfermedad (Calvet, 2012).

1.9.2 Mecanismo de Autoinmunidad

Como ocurre en otras infecciones por microorganismos patógenos intracelulares, la infección por *T. cruzi* moviliza múltiples mecanismos humorales y celulares de la respuesta inmune innata y adquirida. En consecuencia, el parásito es continuamente atacado disminuyendo su número en los tejidos del hospedador. No obstante, persiste indefinidamente como la respuesta inmunitaria. Una actividad inmunológicamente prolongada, eventualmente puede conducir a la acumulación de alteraciones que afectan al músculo cardíaco. Las evidencias experimentales involucran al sistema inmunitario en la patología de la enfermedad, causando controversias en cuanto a su origen (Brener, 2000).

La autoinmunidad se puede observar en pacientes y modelos animales y puede deberse a una activación policlonal linfocitaria o mimetismo molecular. Existe una intensa respuesta inmunológica a la presencia del parásito con la consecuente activación policlonal de linfocitos T y B. La activación excesiva podría causar la producción de anticuerpos auto-reactivos y ésta sería mantenida indefinidamente por el hospedador debido a la persistencia de auto-antígenos existentes en los sitios de inflamación (Brener, 2000).

El mimetismo de antígenos de agentes infecciosos puede inducir una respuesta cruzada autoinmune a epítopes presentes en proteínas del hospedador. Actualmente se han identificado diversos epítopes que participan en el fenómeno de mimetismo. Entre los diversos auto-antígenos descritos podemos nombrar:

- 1) Antígeno B13: Fue evidenciada la reactividad cruzada entre la proteína B13 del parásito y la miosina cardíaca en humanos y modelos experimentales, debido a la homología de la secuencia epítipo de la proteína B13 (AAAGDK) y del hexapéptido de la cadena pesada de la miosina cardíaca (AAALDK). Neto-Cunha, (1995) demostró la existencia de una alta prevalencia de anticuerpos contra miosina cardíaca en pacientes con cardiomiopatía crónica chagásica con respecto a un grupo asintomático, Luego Vicco, (2013) señala la posible relación entre la cantidad de anticuerpos contra miosina cardíaca y la progresión de las afecciones cardíacas.
- 2) Antígeno (PO): Proteína ribosomal del parásito (PO) cuya secuencia (AAAESEEEEDDDDDF) es idéntica de la secuencia del segundo bucle extracelular de receptor β 1 adrenérgico (AESEE). Se ha demostrado la presencia de anticuerpos contra ambos epítopes en pacientes con ECh (Levin, 2008; Ferrari, 1995); También se ha evidenciado la presencia de auto anticuerpos dirigidos contra el segundo bucle de los receptores β 2 adrenérgico y M2 muscarínicos en suero de pacientes con ECh y con cardiopatía dilatada por homología a la misma proteína (Mijares, 1996) .

- 3) Antígeno F1-160: Proteína de superficie de *T. cruzi*, cuya secuencia (TPQRKTTEDRPQ) es homologa a una proteína del tejido nervioso encontrada en células del plexo mientérico, La presencia de auto anticuerpos dirigidos a esta proteína fue demostrada en pacientes infectados, y estarían involucrados con patologías digestivas en la fase crónica de la enfermedad, como serían megacolon y megaesofago (Van Voorhis, 1991).

1.9.3 Auto-anticuerpos anti receptores β 1 adrenérgicos implicados en la cardiomiopatía chagásica.

La homeostasis del sistema cardiovascular es controlada por el sistema nervioso simpático (SNS) y parasimpático (SNP); integrantes del sistema nervioso autónomo. Múltiples señales químicas y físicas bombardean permanentemente la superficie de las células. Esas señales se unen a receptores situados en la superficie de las células e inician un flujo de información que pasa al interior de la célula (Tacchi, 2008).

Los receptores acoplados a las proteínas G, entre ellos los receptores β adrenérgicos constituyen la familia de receptores más abundante y con una mayor variabilidad de ligandos, entre los que se incluyen péptidos, proteínas, derivados de aminoácidos, lípidos, nucleótidos e iones. Los receptores β adrenérgicos representan el 80 % de los receptores cardiacos encontrándose principalmente en el nodo sinoauricular y en el sistema de conducción ventricular (Jahns, 2006), estos poseen al igual que todos los receptores acoplados a las proteínas G una estructura similar en la que se puede distinguir 3 dominios principales (figura 3):

- 1) Dominio extracelular en el que se encuentra la secuencia de unión al ligando.
- 2) Dominio transmembrana, caracterizado por presentar 7 alfa hélices transmembrana, unidas entre sí por tres bucles intracelulares y tres extracelulares.
- 3) Dominio intracelular en el que se destaca una zona de unión para la proteína G y una serie de secuencias de fosforilación que participan en el mecanismo de inhibición del receptor.

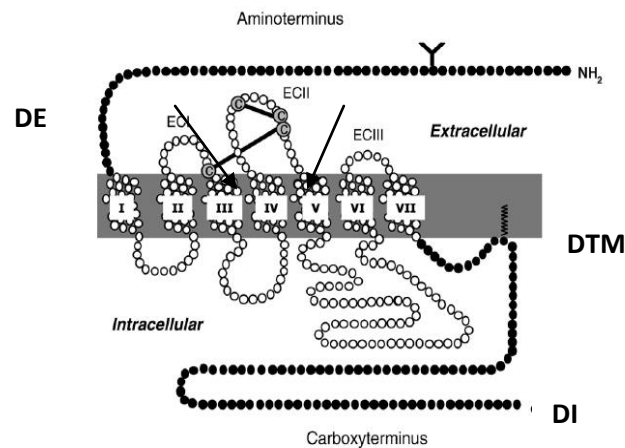


Figura 3. Estructura molecular del receptor β_1 adrenérgico humano. Se observa cada uno de los dominios. DE: Dominio extracelular, DTM: Dominio transmembrana, DI: Dominio Intracelular. (Flechas) indican la zona de reconocimiento de los auto-anticuerpos (imagen tomada de Jahns, 2006).

Desde el punto de vista funcional los receptores se caracterizan por estar acoplados a unas proteínas denominadas proteínas G heterotrimericas, que se clasifican en 4 familias Gs, Gq, Gi, G_{12} . Estando el receptor de interés acoplado a la proteína Gs y cuyo principal efector es la adenilato ciclasa (Sanz, 2011).

Las proteínas G son GTPasas triméricas que se encuentran unidas a la cara citoplasmática de la membrana plasmática. Están constituidas por tres subunidades (α , β , γ), donde las subunidades β y γ son indisociables, por lo que se comportan como una unidad funcional. Para que se dé la activación de estas proteínas el dominio transmembrana es un elemento clave. La unión del ligando al receptor, genera cambios conformacionales de este dominio que va a modificar, a su vez, la conformación del segundo y tercer bucle intracelular aumentando su afinidad por la subunidad α de la proteína G. tras unirse al receptor la subunidad α intercambia GDP por GTP y sufre un cambio conformacional que promueve su separación de las subunidades $\beta\gamma$. Una vez separadas se vuelven funcionalmente activas (Gutkind, 1998).

Después de la separación de las subunidades $\beta\gamma$, la subunidad α , activa a otra proteína de membrana, la adenilato ciclasa (AC) que genera cAMP a partir de la molécula de ATP, aumentando los niveles intracelulares de dicho mensajero. El incremento de los niveles de cAMP determinará, a su vez, la activación de una serina/ treonina quinasa denominada proteína-quinasa A, la cual presenta dos subunidades una catalítica y otra reguladora, la unión del cAMP a las subunidades reguladoras causa la disociación del complejo, liberando unidades catalíticas que serán las responsables de la fosforilación de residuos serina y/o treonina de determinadas proteínas, tales como la CREB (proteína que actúa como factor de transcripción), que al ser fosforilada se une a elementos de respuesta génicos, estimulando la transcripción de determinados genes, también ocurre la fosforilación de los canales de calcio, lo cual promoverá la entrada de este ion al interior celular, considerándose un tipo de canal activado por segundos mensajeros o mejor conocido como canales metabotrópicos (Gutkind, 1998; Arce, 2006), Otro sustrato de gran importancia de la PKA es la fosfolambana, involucrada en la regulación de la actividad contráctil y de relajación del miocardio (Sanz, 2011).

Existe la integración de diferentes vías de señalización tras la activación de la proteína G. Otra proteína que se activará al disociarse la subunidad α , es una fosfolipasa de membrana (PLC- β), la cual, producirá la hidrólisis de un fosfolípido de membrana, el fosfatidil inositol bifosfato (PIP₂), generando dos productos: diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP₃). El IP₃ es una molécula que difunde por el citosol, uniéndose a

receptores específicos localizados en el retículo endoplásmico rugoso. Estos receptores son canales de calcio, lo que determina la salida de calcio del retículo y, por lo tanto, el aumento de este ion en el citoplasma. Este aumento de la concentración de calcio va a ser responsable, de la activación de diferentes enzimas, entre las que destacan las CaM-quinasa o quinasas dependientes de calcio y calmodulinas. (Gutkind, 1998; Arce, 2006).

Cuando ocurre una actividad adrenérgica descontrolada, puede con el tiempo alterar la función cardíaca por diversos mecanismos, dentro de los que se incluyen, sobrecarga de calcio, aumento de permeabilidad del sarcolema y muerte miocítica, siendo estos efectos probablemente mediados por los receptores β_1 adrenérgico. La estimulación crónica de estos receptores puede provocar cambios en el fenotipo de los miocitos (Serra, 2010).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACION

La Sección de Inmunología del Instituto de Medicina Tropical-UCV, como centro de referencia nacional para el estudio de la ECh, realiza el seguimiento médico-parasitológico de pacientes infectados con *Trypanosoma cruzi* en distintas fases de evolución de la enfermedad. El brote oral de ECh diagnosticado en la Escuela Municipal Andrés Bello, en el Municipio Chacao de Caracas en el año 2007, es el más numeroso diagnosticado y publicado en la literatura mundial hasta el momento (Alarcón de Noya, y col., 2010). En este brote de Enfermedad de Chagas por vía oral (EChO) fueron expuestas aproximadamente 1000 personas (principalmente niños), de las cuales 103 desarrollaron infección y una de ellas murió. Los resultados observados luego de la administración del primer tratamiento antiparasitario, no han sido satisfactorios, ya que siete años más tarde, aún es posible encontrar cerca de 70% de pacientes con persistencia de anticuerpos IgG, presencia de anticuerpos líticos, PCR positivas para marcadores de ADNk y ADN satélite, en algunos casos parásitos circulantes en sangre periférica y recientemente, alteraciones cardíacas en algunos de los pacientes infectados. Los factores promotores del desarrollo de una miocardiopatía chagásica han sido estudiados por muchos años y pese a la aplicación de la más moderna tecnología, hasta los momentos no se tiene una respuesta clara de la patología cardíaca y el por qué estas alteraciones sólo aparecen en menos de un tercio de la población infectada. Estudios realizados por Magnusson y col. (1991) demostraron por primera vez la presencia de anticuerpos anti- β 1 adrenérgicos en pacientes con cardiopatías debidas a diversas causas. Para el caso de ECh, investigaciones realizadas por Calzada (2009), Gimenez (2002), Chiale (1994) y Sanz (2011), han encontrado niveles elevados de estos anticuerpos en suero de pacientes en fase crónica indeterminada y cardiópatas crónicos con otras etiologías de cardiopatías.

Por tal motivo, el presente trabajo de investigación pretende determinar la prevalencia de los anticuerpos anti- β 1 adrenérgicos en pacientes venezolanos con ECh en distintas fases de evolución de la enfermedad (fase aguda, crónicos recientes, fase indeterminada y cardiopatas chagásicos crónicos). Conjuntamente se evaluará la cinética de estos anticuerpos mediante un estudio longitudinal de pacientes pertenecientes al Brote de EChO ocurrido en la Escuela Municipal Andrés Bello, en el Municipio Chacao de Caracas

en el año 2007, con el fin de determinar la importancia de los anticuerpos anti-receptores β 1 adrenérgicos en el avance de la patología cardíaca chagásica, además de establecer, si la detección temprana de estos anticuerpos en pacientes que aún no han desarrollado cardiopatía, podría ser un indicativo de la instalación de un daño miocárdico.

La investigación estuvo limitada a la estandarización y medición de la seroprevalencia de anticuerpos anti-receptores adrenérgicos en grupos de pacientes con ECh en distintas fases de la infección comparándolos con la seroprevalencia de anticuerpos en cardiópatas con otras etiologías y controles sanos, quienes acudieron a la Sección de Inmunología (SI) del Instituto de Medicina Tropical (IMT) de la Universidad Central de Venezuela. Este trabajo se enmarca en la línea de investigación: “Biomarcadores de evolución y morbilidad en pacientes agudos y crónicos con enfermedad de Chagas” y aportará un conocimiento básico para el manejo y decisión a tomar en la atención de los pacientes con ECh de la SI –IMT.

HIPOTESIS DEL TRABAJO

En la ECh, la alteración cardíaca es la manifestación más frecuente, afectando entre el 20-40% de los individuos luego de años o décadas de la infección inicial. Estas alteraciones son la causa más importante de miocardiopatía en América Latina y áreas endémicas, siendo la principal causa de muerte en pacientes entre 30 y 50 años de edad. La presencia de anticuerpos anti-receptores β_1 adrenérgicos pueden desencadenar señales intracelulares y alterar la función cardíaca durante el curso de la infección por *Trypanosoma cruzi*.

Luego de siete años post-infección, es de esperar que alrededor del 30% de los pacientes involucrados en el brote de Enfermedad de Chagas por vía oral ocurrido en la Escuela Andrés Bello del Municipio Chacao, puedan estar presentando el inicio de alguna alteración cardíaca, por tal motivo, el estudio de la presencia de anticuerpos anti-receptores β_1 adrenérgicos dentro de esta población de pacientes debe revelar una prevalencia elevada y significativamente mayor que en individuos sanos o con cardiopatías no chagásicas.

3. ANTECEDENTES

Durante la evolución de la ECh desde la fase aguda hasta desarrollarse una enfermedad cardíaca crónica es evidente que la secuencia de modificaciones fisiopatológicas que ocurren a nivel del sistema cardiaco durante la infección, logran dar origen a múltiples alteraciones que desencadenan diversos trastornos, tales como: arritmias y problemas de conducción en un porcentaje de la población infectada (Chiale, 1996).

La presencia de infiltrados de células mononucleares en el corazón de pacientes con ECh fue materia de controversia alrededor de los años 1974 y 1990.

Sterin-Borda (1976), descubrió la presencia de anticuerpos en sueros de pacientes con ECh que afectaban la actividad contráctil de aurículas en ratas, demostrando que estos anticuerpos desencadenan mecanismos que involucran a los receptores β adrenérgicos.

Cossio y colaboradores (1977), estudiaron los cambios morfológicos y la inmunopatología en biopsias del miocardio de 4 pacientes con ECh, observando la presencia de inmunoglobulinas en la membrana plasmática de células del miocardio y en el endotelio, visualizados a través de métodos inmunoquímicos. Ellos sugieren y especulan por las evidencias morfológicas, que las inmunoglobulinas producen alteraciones metabólicas en las fibras del músculo cardiaco y que el daño en estas células podría ser debido a un mecanismo inmunitario mediado por linfocitos contra un antígeno presente en dichas células, considerando que la presencia de estos anticuerpos está involucrada sin dudas en la patogénesis de la enfermedad.

Más adelante Bracco, M y colaboradores (1984), realizaron una serie de experimentos donde evaluaron el efecto estimulante de linfocitos aislados del suero de pacientes con ECh en contraste con la aplicación de fármacos bloqueadores. En esta investigación ponen en evidencia los mecanismos que ejercen los anticuerpos en la actividad contráctil de la aurícula de las ratas.

Frielle y colaboradores (1987), clonaron y secuenciaron el DNAC del receptor $\beta 1$ adrenérgico de humanos, para mostrar la homología que presentaban los miembros de este grupo de receptores en humanos y ratones. Donde analizaron cada una de las estructuras

que se conservaban, incluyendo los siete dominios transmembrana, los sitios de glicosilación cerca de la región amino terminal y secuencias de aminoácidos homólogos dentro de la región transmembrana.

Magnusson y colaboradores (1991), luego de la exitosa clonación y secuenciación del receptor β 1- adrenérgico realizado por Frielle y colaboradores, utilizando un péptido sintético derivado de la segunda asa extracelular del receptor β 1 adrenérgico de humanos y realizando diferentes experimentos, demostraron que se podían inmunizar animales y que los anticuerpos purificados presentaban propiedades funcionales similares a los encontrados en humanos. Al mismo tiempo, enfrentaron sueros de pacientes con cardiomiopatía dilatada idiopática al péptido sintético, donde se comprobó la presencia de anticuerpos específicos al péptido, a través, de pruebas de inmunoensayo enzimático (ELISA). Ese mismo año Goin y colaboradores evaluaron la distribución de auto-anticuerpos contra los receptores β 1 adrenérgico en el curso de la infección, encontrando en la fase aguda de la infección bajos niveles de prevalencia de anticuerpos, alcanzando un punto máximo en un grupo asintomático 15 años después de la infección.

Mijares y colaboradores (1996), reportaron en ratones infectados con *T. cruzi* la presencia de anticuerpos en dos fases de la ECh (Agudo y Crónico), los cuales reconocían específicamente la segunda asa extracelular del receptor β 1 adrenérgico y M2 muscarínicos asociados al corazón.

Chiale, P y colaboradores (1999), publicaron la prevalencia de estos anticuerpos en pacientes con diversas patologías cardíacas, para determinar los efectos funcionales y bioquímicos, estableciendo un nexo patogénico entre la presencia de los anticuerpos y las arritmias que ocurren en el contexto de la cardiopatía idiopática y cardiopatía crónica chagásica.

Wallukat, G y colaboradores (2000), realizaron una comparación de los efectos que promovían los anticuerpos anti-receptores β 1 adrenérgico y M2 muscarínicos de pacientes con cardiomiopatía dilatada idiopática y pacientes con ECh, demostrando que ambos anticuerpos presentaban efectos cronotrópicos contrarios; es decir, los receptores β 1 adrenérgicos son estimulados y activados por los anticuerpos anti- β 1 adrenérgicos y su

actividad es inhibida por parte de los anticuerpos M2 muscarínicos. También evaluó la existencia de una mayor afinidad (alrededor del 80%) de los anticuerpos hacia el receptor $\beta 1$ adrenérgico.

Gimenez y colaboradores (2002), estudiaron la asociación entre la ECh con cardiopatías o no y la presencia de los anticuerpos anti receptores $\beta 1$ adrenérgicos, obteniendo como resultado que el grupo con cardiomiopatías que presentaban arritmias ventriculares mostraban una alta prevalencia de los anticuerpos (80%) y disminuían en aquellos pacientes en periodo indeterminado de la enfermedad (59%). Sin embargo no encontraron una correlación entre el origen de las manifestaciones clínicas y la presencia de los auto-anticuerpos.

Jahns y colaboradores (2006), realizaron una revisión completa de todos los trabajos realizados en el área hasta el año 2006, donde no solo expone el papel de los anticuerpos en el daño cardiaco sino también discute la relación que tienen estos anticuerpos con las diferentes cardiopatías, comprobadas en modelos animales, donde Elies, 1996, Wallukat, 1995, Iwato, 2001 y Jahns, 1999, han observado en sus investigación que la prevalencia es significativa en cardiomiopatías isquémicas (10%), en cardiomiopatías chagásica con el 30% o más dependiendo de la fase de la enfermedad y , más notable, en cardiomiopatía dilatada , cuya prevalencia varía entre un 26% a 95% en los pacientes. Recomendando para un futuro la estandarización adecuada de métodos que puedan correlacionar las manifestaciones clínicas con la presencia de estos anticuerpos.

Vicco y colaboradores (2014), evaluaron 80 pacientes diagnosticados con ECh, categorizándolos en tres grupos de acuerdo al estado clínico de cada paciente, logrando saber en qué estado de la enfermedad se encontraban. No observaron una diferencia significativa entre los niveles de anticuerpos en los dos primeros grupos pertenecientes a la fase indeterminada, mientras que en aquellos pacientes con un daño cardiaco evidente se mantenían altos niveles de anticuerpos anti- receptores $\beta 1$ adrenérgicos.

4. OBJETIVOS

Objetivo General:

Establecer la frecuencia de anticuerpos anti-receptores $\beta 1$ adrenérgicos en las distintas fases de la Enfermedad de Chagas y compararla con cardiopatías de otro origen.

Objetivos Específicos:

- Estandarización de la prueba de inmunoensayo enzimático (ELISA) para la detección de anticuerpos anti-receptores $\beta 1$ adrenérgico en sueros de pacientes con (ECh).
- Determinar mediante la prueba de inmunoensayo enzimático (ELISA) la frecuencia de anticuerpos anti-receptores $\beta 1$ adrenérgicos en pacientes en diferentes etapas de la ECh, con y sin cardiopatía, y compararlos con pacientes cardiópatas y controles sanos.
- Evaluar la cinética de la frecuencia de anticuerpos anti-receptores $\beta 1$ adrenérgicos en un grupo de pacientes con ECh en fase aguda inicialmente y su evolución en 7 años

5. MATERIALES Y METODOS

Población y muestras

Se trabajará con muestras de sueros de individuos clasificados en seis (6) grupos en base a las pruebas diagnósticas y al estado evolutivo de la enfermedad.

1. Grupo en Fase Aguda (FA) (n: 43): Pacientes con serología positiva (IgM), con demostración directa del parásito y/o PCR positiva.
2. Grupo Crónicos Recientes (CR) (n: 44): Pacientes conocidos del brote de EChO de Chacao con serología positiva (IgG), con evidencias de actividad parasitaria (Anticuerpos Liticos o PCR positiva) con o sin aspectos clínicos anormales en el electrocardiograma (ECG); pero sin alteración en el tamaño del corazón (basado en la radiografía de tórax).

Los grupos que se presentan a continuación se clasificaron en base a los criterios de clasificación de Kuschnir, (1985).

3. Grupo en Fase indeterminada (FI) (n: 46): Pacientes adultos procedentes de la Consulta externa de la S.I - IMT con serología positiva (IgG) con aspectos clínicos normales (basado en la radiografía de tórax).
4. Grupo de pacientes crónicos cardiopatas con ECh (CCECh) (n: 43): Serología positiva (IgG), hallazgos anormales en el (ECG), cardiomegalias, aumento del ventrículo izquierdo con insuficiencia cardíaca.
5. Grupo Cardiopatas sin ECh (CsEch) (n: 33): Serología negativa para ECh con hallazgos anormales en el (ECG), cardiomegalia, aumento del ventrículo izquierdo con insuficiencia cardíaca.
6. Grupo Control (GC) (n: 23): Sueros de individuos sanos, con serología negativa para la ECh y sin antecedentes de algún padecimiento cardiaco.

Para el estudio longitudinal se trabajó con un total de 532 muestras de suero de 76 pacientes con ECh en fase aguda de un brote de Chacao, a los cuales se le ha realizado un seguimiento de la enfermedad durante 6 años (2008-2014).

Se tomarán las muestras del Banco de Sueros de la S.I del IMT obtenidos del proyecto “Biomarcadores de evolución en pacientes agudos y crónicos con Enfermedad de Chagas”

Péptidos.

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 y col., 1996), cuya secuencia fue confirmada por espectrometría de masas en Acuapeptide síntesis, núcleo de biotecnología (NBC) Chile.

El péptido $\beta 1$ sintetizado contiene los aminoácidos 183 al 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).

Estandarización

Se determinaron las concentraciones óptimas del antígeno (30 μ g/ml, 50 μ g/ml y 70 μ g/ml), dilución óptima de los sueros (1/20, 1/50, 1/60) y el título óptimo del conjugado (anti-IgG humano, acoplado a fosfatasa alcalina). Los ensayos se realizaron en placas de microtitulación de 96 pozos con sueros previamente caracterizados, de modo que se escogieron sueros positivos de alta, media y baja reactividad, así como también sueros negativos (Figura 4).

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 triatomíneos. A partir de las lecturas obtenidas, se calculó la media aritmética y la desviación estándar, y se definió el punto de corte como la media más 2 desviaciones estándar.

Para la validación de la técnica se calcularán los siguientes indicadores a través de una tabla de contingencia según Ochoa, 2012.

Se utilizaron 37 sueros controles positivos que corresponden a pacientes con algún padecimiento cardíaco (Arritmias, Cardiomiopatía dilatada, cardiomegalia), donde se ha reportado la presencia de los anticuerpos contra el receptor β_1 adrenérgico y 37 controles negativos a la ECh que corresponden a menores de 30 años y sin historial de padecimientos cardíacos.

Tabla 1. Método de cálculo de cada uno de los indicadores de validación utilizando tabla de contingencia.

Ensayo evaluado	Positivo	Negativo	Total
Positivo	VP	FP	VP+FP
Negativo	FN	VN	FN+VN
Total	VP+FN	FP+VN	n=VP+FP+FN+VN

VP: Verdadero positivo

VN: Verdadero negativo

FP: Falso positivo

FN: Falso negativo

- Sensibilidad: $\frac{VP}{(VP+FN)} \times 100$
- Especificidad: $\frac{VN}{(FP+VN)} \times 100$
- Valor predictivo positivo: $\frac{VP}{(VP+FP)} \times 100$
- Valor predictivo negativo: $\frac{VN}{(FN+VN)} \times 100$
- Eficacia: $\frac{(VP+VN)}{(VP+FP+FN+VN)} \times 100$
- Índice Kappa: $\frac{(po-pe)}{(1-pe)}$

Donde: $po = \frac{(VP+VN)}{n}$; $pe = \frac{(P+N)}{n}$

Concordancia en el caso de positivos $P = \frac{(VP+FP)}{n} \times \frac{(VP+FN)}{n} \times n$

Concordancia en el caso de negativos $N = (FN + VN) - (VP + FN) - P$

		Concentración del péptido											
		30µg/ml				50µg/ml				70µg/ml			
Conjugado		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1/500	A												
	B												
	C												
	D												
1/1000	E												
	F												
	G												
	H												

Fig. 4 Esquema metodológico de la estandarización del inmunoensayo enzimático ELISA para la selección de la concentración idónea del péptido y título óptimo del conjugado. Los espacios rellenos corresponden a los pocillos donde se colocaron los sueros previamente seleccionados.

Determinación de anticuerpos anti-receptores por medio de inmunoensayo enzimático (ELISA):

El ELISA se realizó según el método modificado de Tovar (2009). Se utilizaron placas de poliestireno (maxisort, NUNC®), las cuales fueron sensibilizadas con 50 µl del péptido sintético del receptor β1 adrenérgico a una concentración 50 µg/ml y se incubaron a 4°C por 18 horas. Al día siguiente se realizó un lavado de la placa con PBS pH 7,2- tween 20 al 0,05% (solución de lavado).

Se agregaron por duplicado 50 µl de los sueros de cada paciente, diluidos 1/50 en PBS pH 7,2- tween 20 al 0,05% y leche descremada al 5% (Solución bloqueadora), fueron incubados a 4°C por 18 horas. Las placas fueron lavadas 3 veces con PBS pH 7,2- tween 20 al 0,05% (solución de lavado) y luego se agregaron 50 µl de suero anti-IgG de humano conjugado a fosfatasa alcalina (Sigma A3150-1ml), diluido 1/500 en PBS pH 7,2- tween 20

al 0,05% y leche descremada al 5% (Solución bloqueadora), se incubaron a 37°C por 90 minutos y se volvieron a lavar las placas 3 veces con solución de lavado.

Se agregaron 50 µl del sustrato p-nitrofenilfosfato, diluido en buffer dietanolamina (DEA), pH 10 (1mg/ml) y se incubó a 30°C por 15 min. Para detener la reacción se añadieron 50 µl de NaOH 1M y se realizó la lectura en un lector de micro placa ELISA a una densidad óptica (DO) 405 nm.

Análisis Estadístico.

Los resultados cualitativos del objetivo uno luego de haber realizado un estudio de análisis de normalidad y homogeneidad de varianza, los datos obtenidos fueron comparados con el estadístico t-Student para datos no paramétricos, considerándose al valor de $P < 0,05$ como de significancia estadística.

Para el estudio longitudinal se realizó una correlación entre la cantidad de los anticuerpos anti-receptores β_1 adrenérgicos y porcentajes de anticuerpos líticos post tratamiento en 4 grupos seleccionados con un total de 49 pacientes mediante el estadístico de Karl Pearson, considerándose una correlación perfecta de las variables igual a 1 o -1. Los porcentajes de anticuerpos líticos de cada paciente fueron proporcionados por la SI.

Consideraciones Bioéticas.

El estudio cuenta con la aprobación y AVAL del Comité Ético Científico del Instituto de Medicina Tropical de la UCV (Anexo). Todos los pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión establecidos cuentan con su respectivo consentimiento informado.

6. RESULTADOS

6.1 Estandarización de la técnica de Inmunoensayo enzimático ELISA para la detección de anticuerpos IgG dirigidos contra la segunda asa extracelular de receptor $\beta 1$ adrenérgico.

Para la estandarización y elección de la concentración idónea del antígeno y dilución óptima del suero para la realización de la prueba a emplear ELISA, se seleccionó como dilución óptima del conjugado aquella recta 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 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 5).

Se realizaron tres diluciones de los sueros controles positivos y negativos, donde 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 $R^2 \geq 0,98$, el cual, indica que aproximadamente el 98% de variación total de los valores en Y están relacionados con las variables X (Figura 6).

La estandarización de la prueba se resume en la tabla 2: concentración óptima del antígeno para ELISA fue de 50 $\mu\text{g/ml}$, dilución del suero 1/50 y del conjugado 1/500. Estas condiciones, se ensayaron con 46 personas no cardíopatas sin antecedentes de contacto con triatomíneos a fin determinar el punto de corte que se fijó en D.O 0,278 nm.

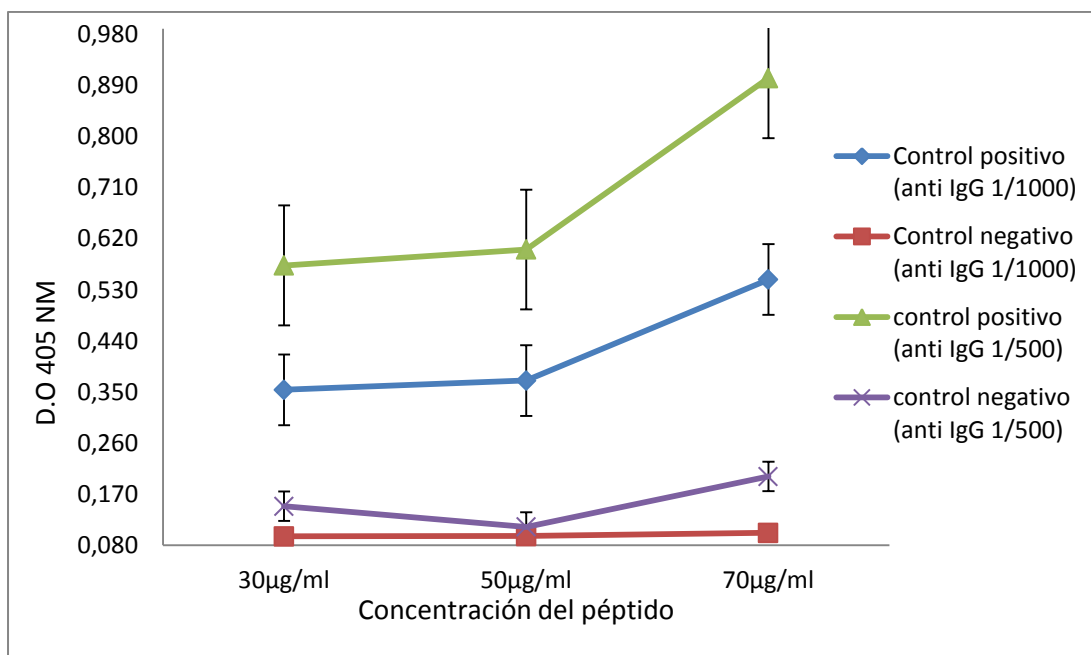


Fig. 5 Comportamiento de las diferentes concentraciones del antígeno (péptido) frente a una dilución 1/50 de los sueros controles y diluciones del conjugado 1/1000 y 1/500.

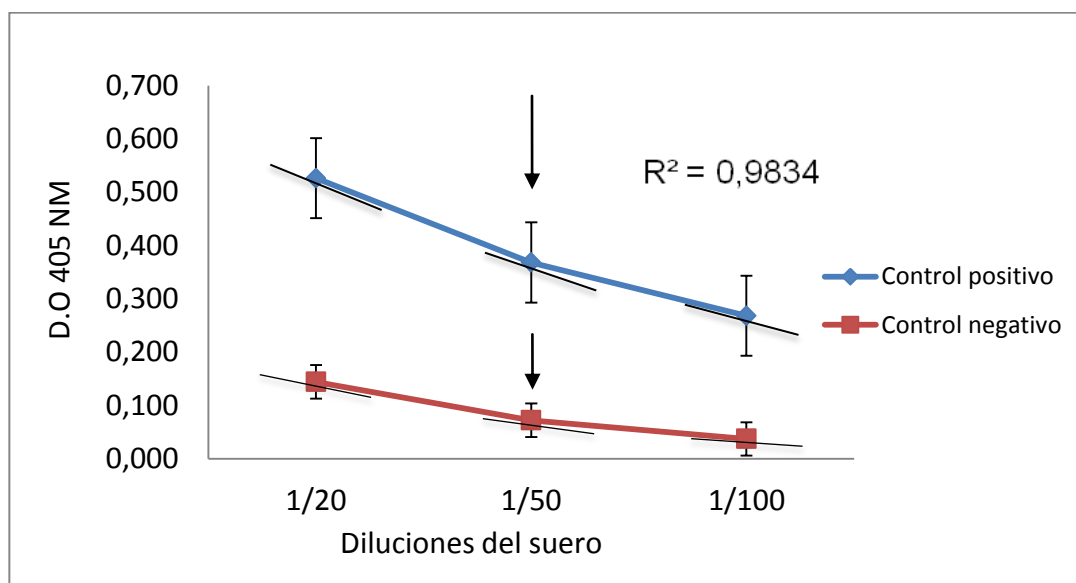


Fig. 6 Evaluación de las diferentes diluciones de suero (1/20, 1/50 y 1/100), con una concentración del péptido de 50 µg/ml y el conjugado diluido 1/500, se muestra la dilución óptima seleccionada (flechas) y el $R^2 \geq 0,98$ alcanzado.

Tabla 2. Concentración y diluciones óptimas del suero y conjugado seleccionadas para realizar la prueba de ELISA y detectar anticuerpos anti- β 1 adrenérgicos.

Prueba	Antígeno	Suero	Conjugado	Punto de Corte
ELISA	50 μ g/ml	1/50	1/500	0,278
Tiempos de incubación	18 horas	18 horas	90 min	
Temperatura de incubación	4°C	4°C	37°C	

Se muestra en la tabla 3 los valores obtenidos en la estandarización para realizar los cálculos correspondientes de los indicadores para la validación de la prueba ELISA para la detección de anticuerpos β 1 adrenérgicos. Treinta y siete (37) sueros de referencia positivos y negativos cuyas condiciones se mencionan en la metodología, los cuales arrojaron una concordancia con índice Kappa de 0,84 con una sensibilidad de 93 % y especificidad del 81%, junto a un valor predictivo positivo del 78 % y negativo del 95 %. Estos datos no pueden ser comparados ya que no existen trabajos de referencia donde se muestre la estandarización de esta prueba con el péptido en cuestión (Tabla 4).

Tabla 3. Valores obtenidos en la estandarización del inmunoensayo enzimático ELISA.

		Receptor β 1 adrenérgico		
IgG de <i>T. cruzi</i>	Ensayo evaluado	Positivo	Negativo	Total
	Positivo	29	8	37
	Negativo	2	35	37
	Total	31	43	74

Tabla 4. Indicadores de validación de la prueba de inmunoensayo enzimático ELISA para detectar anticuerpos anti- β 1 adrenérgico con sueros referencia.

Indicadores de validación	Porcentaje (%)
Sensibilidad	93
Especificidad	81
valor predictivo positivo	78
valor predictivo negativo	95
Eficacia	86
Índice Kappa	0,84

6.2 Determinación de anticuerpos β 1 adrenérgicos en distintas fases de la enfermedad

Se evaluó la inmunoreactividad al péptido β 1 adrenérgico sintético de los sueros de todo el grupo de pacientes con ECh y cardiópatas sin ECh. Se comparó de manera general para tener una observación global de la prevalencia de los anticuerpos anti β 1 adrenérgicos de estos grupos con el grupo control (Figura 7). El grupo de pacientes con ECh mostró un porcentaje de prevalencia de estos anticuerpos del 50% a diferencia del grupo cardiópatas sin ECh con un porcentaje del 42%. Entre ambos grupos no mostraron diferencias estadísticamente significativas (Tabla 6).

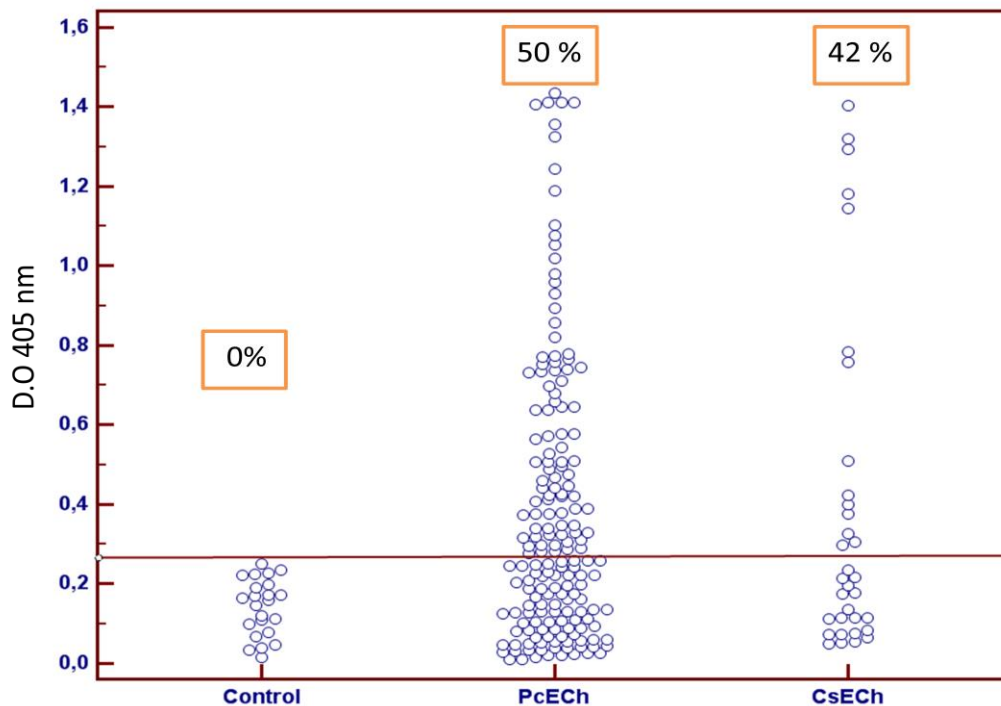


Fig.7 Inmunoreactividad de los sueros con el péptido $\beta 1$ adrenérgico en la prueba de ELISA. Control: Suero de pacientes sin ECh y sin historial de padecimientos cardiacos. **PcECh:** Suero de pacientes con ECh. **CsECh:** suero de pacientes cardíopatas sin ECh. La línea indica el punto de corte, por encima de estas se considera positivos a la prueba.

Al tomar el grupo de pacientes con ECh y dividirlos según la evolución clínica de la enfermedad, se puede observar que en el grupo de pacientes en fase aguda de la enfermedad, el porcentaje de prevalencia de estos anticuerpos es del 87%. A medida que evolucionan los pacientes a la fase crónica ocurre una disminución en la reactividad del 27 % que al pasar los años se ve aumentada a un 41% en lo que corresponde a la fase indeterminada, los pacientes crónicos con ECh y cardiomiopatías mantienen un porcentaje de reactividad del 47%, cercano al porcentaje de los pacientes cardiópatas sin ECh (Figura 8).

El porcentaje de prevalencia de anticuerpos anti-receptor β_1 adrenérgico en las distintas fases de la ECh se resume en la tabla 5.

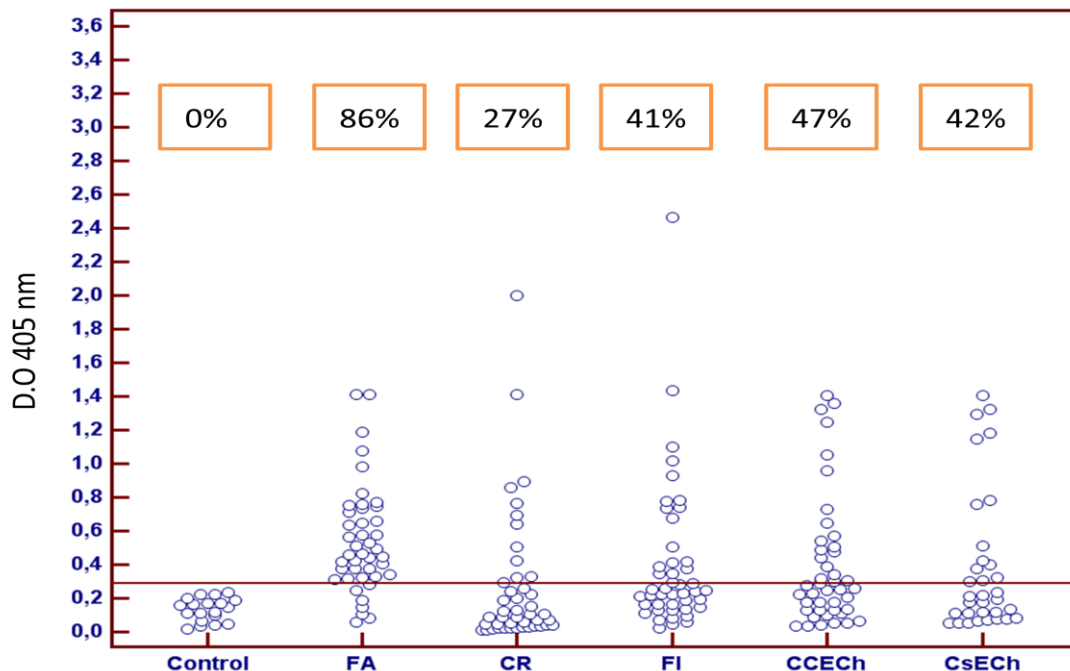


Fig. 8 Inmunoreactividad de los sueros con el péptido β_1 adrenérgico en la prueba de ELISA y su prevalencia. Control: Suero de pacientes sin ECh y sin algún padecimiento cardiaco. FA: Suero de pacientes en fase aguda de la Enfermedad. CR: suero de pacientes crónicos recientes. FI: Suero de pacientes en fase indeterminada de la Enfermedad. CCECh: Suero de pacientes crónicos cardiópatas con ECh. CsECh: suero de pacientes cardiópatas.

Tabla 5. Porcentaje de prevalencia de anticuerpos anti-receptor $\beta 1$ adrenérgico en las distintas fases de la enfermedad y en el grupo control.

Grupos	Anticuerpos $\beta 1$ adrenérgico	
	Numero Positivo/total	%
Fase aguda (FA)	37/43	86
Crónicos recientes (CR)	12/44	27
fase Indeterterminada (FI)	19/46	41
Crónicos cardiópatas chagásicos (CCECh)	20/43	47
Cardiópatas sin ECh (CsECh)	14/33	42
Control (GC)	0/23	0%

Análisis Estadístico.

Al comparar el grupo de pacientes con ECh y los pacientes cardiópatas sin ECh (Figura 7) mediante el estadístico t-Student no se observaron diferencias significativas entre las medias.

Se realizó también la comparación entre grupos para evaluar la existencia de diferencias significativas entre cada una de las fases de la enfermedad con respecto a la presencia de anticuerpos dirigidos contra el péptido $\beta 1$ adrenérgico. Al comparar el grupo control vs el grupo en fase aguda presentó una diferencia estadísticamente significativa de igual modo que en fase indeterminada, crónicos cardiópatas con ECh y cardiópatas sin ECh (Figura 8).

Por último, se comparó cada una de las fases con respecto al grupo de crónicos cardiópatas con ECh, existiendo diferencias estadísticamente significativas entre la fase aguda y los crónicos recientes, a diferencia del grupo en FI que no mostro una diferencia significativa (tabla 6).

Tabla 6. Prueba estadística t-Student para datos no paramétricos

Grupos comparados	valor de P	¿Son las medias significativamente diferentes? ($P \leq 0.05$)
PcECh vs CsECh	0,0917	NO
Control vs FA	$P < 0.0001$	SI
Control vs CR	0,7717	NO
Control vs FI	0,0006	SI
Control vs CCECh	0,0013	SI
Control vs CsECh	0,021	SI
CCECh vs CsECh	0,948	NO
FI vs CCECh	0,6416	NO
FA vs CCECh	0,050	SI
CR vs CCECh	0,050	SI

PcECh: Pacientes con ECh

CsECh: Cardiopatas sin ECh

FA: Pacientes en fase aguda

CR: Pacientes crónicos recientes

FI: Pacientes en fase indeterminada

CCECh: Crónicos cardiopatas con ECh

6.3 Estudio longitudinal de la frecuencia de anticuerpos anti- $\beta 1$ adrenérgicos en un grupo de pacientes quienes padecieron la fase aguda de ECh y a quienes se les ha realizado seguimiento clínico y de laboratorio por seis años consecutivos.

Durante la evolución de la ECh en un grupo de pacientes inicialmente en una fase aguda, se evaluó la prevalencia de anticuerpos anti- $\beta 1$ adrenérgico obteniéndose una prevalencia del 35%, la cual disminuye y se mantiene hasta julio 2010 en un 27%. A partir del año 2011 hasta el 2014 se puede notar una prevalencia mayor la cual se mantiene entre 40 y 42% respectivamente (Figura 9).

Luego, se seleccionó un grupo de 36 pacientes del estudio longitudinal quienes presentaban las muestras de suero correspondientes a los seis años evaluados y se analizó la prevalencia de anticuerpos anti- $\beta 1$ adrenérgico (Figura 10). Se observa que la proporción de anticuerpos no depende del número de pacientes estudiados en cada año al compararlos con los resultados de la figura 9, donde se obtiene un porcentaje del 41% en el año correspondiente a la fase aguda (enero 2008), porcentaje que disminuye a un 28% hasta 2010, con un aumento progresivo en el año 2011 y 2012 con un 44% y 47%.

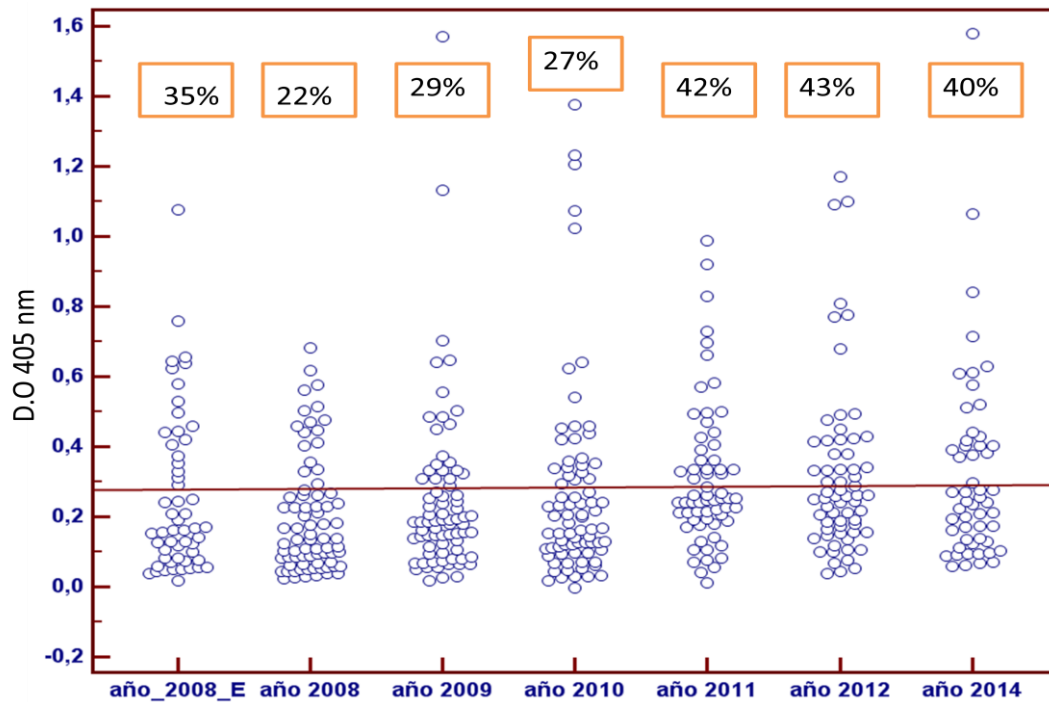


Fig. 9 Cinética de aparición de anticuerpos anti-receptores β_1 adrenérgico durante la evolución de la ECh de un grupo de pacientes, inicialmente en fase aguda (enero del 2008) y su evolución a lo largo de 6 años. Enero 2008 (n= 54), julio 2008 (n=76), julio 2009 (n=76), julio 2010 (n=78), julio 2011 (n= 64), julio 2012 (n= 65) y enero 2014 (n=53).

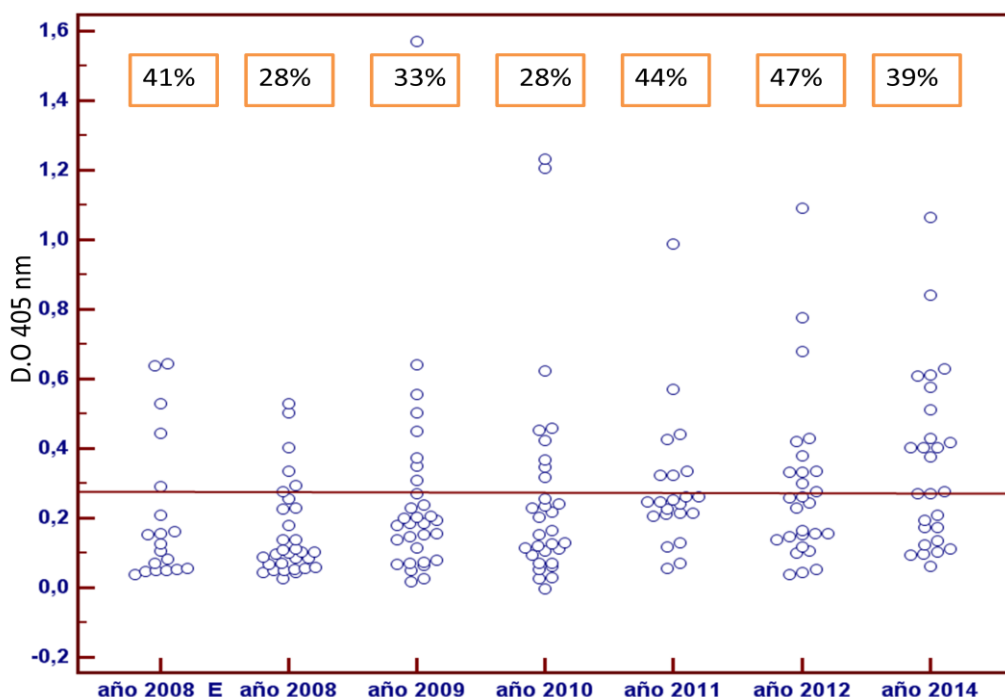


Fig. 10 Frecuencia de aparición de anticuerpos anti- β 1 adrenérgico durante la evolución de la ECh de 36 pacientes seleccionados del estudio longitudinal quienes presentaban la muestra de suero en cada año de estudio.

Como parte del estudio longitudinal se realizó la división de los pacientes en grupos etarios para observar si existían diferencias entre cada grupo con respecto a la prevalencia de anticuerpos en los distintos años evaluados.

Al observarse la figura 11, correspondiente a los pacientes menores de 15 años, los primeros tres años post infección (enero 2008, julio 2008, 2009 y 2010) se observa una baja prevalencia de anticuerpos que varía del 16 al 29% respectivamente, opuesto a los años 2011, 2012 y 2014 en los cuales se evidencia un aumento progresivo en el porcentaje de anticuerpos hasta el 48%.

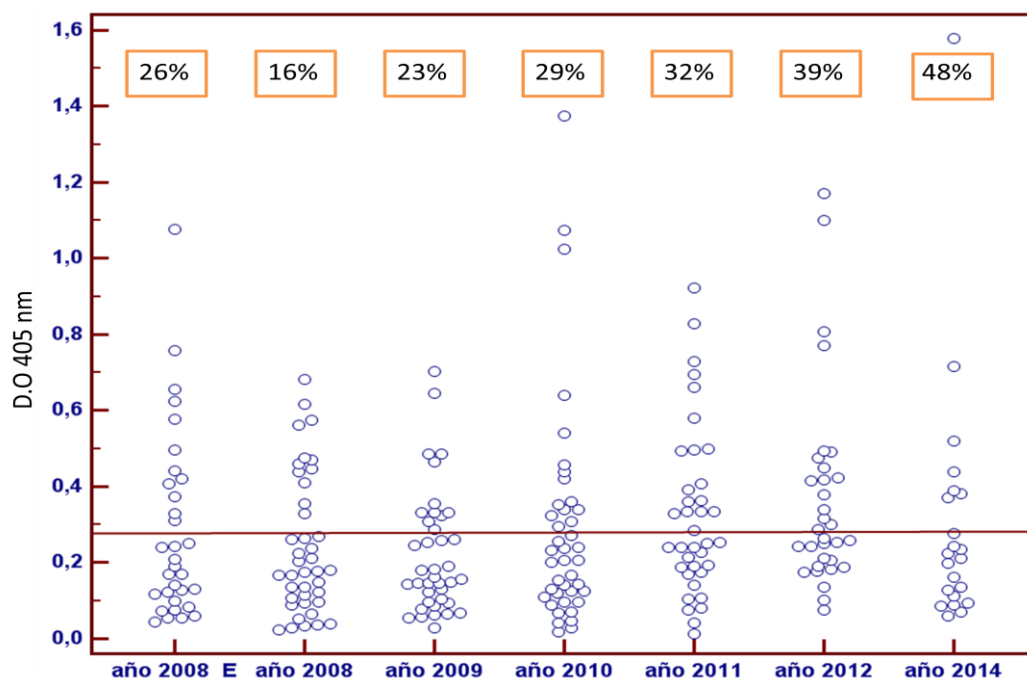


Fig. 11 Prevalencia de anticuerpos anti-β1 adrenérgico durante la evolución de la ECh en Pacientes menores de 15 años del brote oral de Chacao 2007 correspondiente al grupo del estudio longitudinal. Enero del 2008 (n=19), julio 2008, 2009 y 2010 (n=31), Julio 2011 (n=22), julio 2012 (n=28), enero 2014 (n=27).

Se evaluaron 41 pacientes mayores de 15 años, cuya prevalencia de anticuerpos es ligeramente mayor al grupo de pacientes menores de 15 años (figura 12). La prevalencia en los tres primeros años varía entre el 30 al 38% y aumentan en el año 2011 y 2012 a un 46 y 47% con una leve disminución en el año 2014. Cabe recalcar que el patrón de prevalencia de los anticuerpos en los diferentes años se mantiene en ambos grupos; es decir; se observa un porcentaje bajo en los primeros años, que aumenta a partir del 2011.

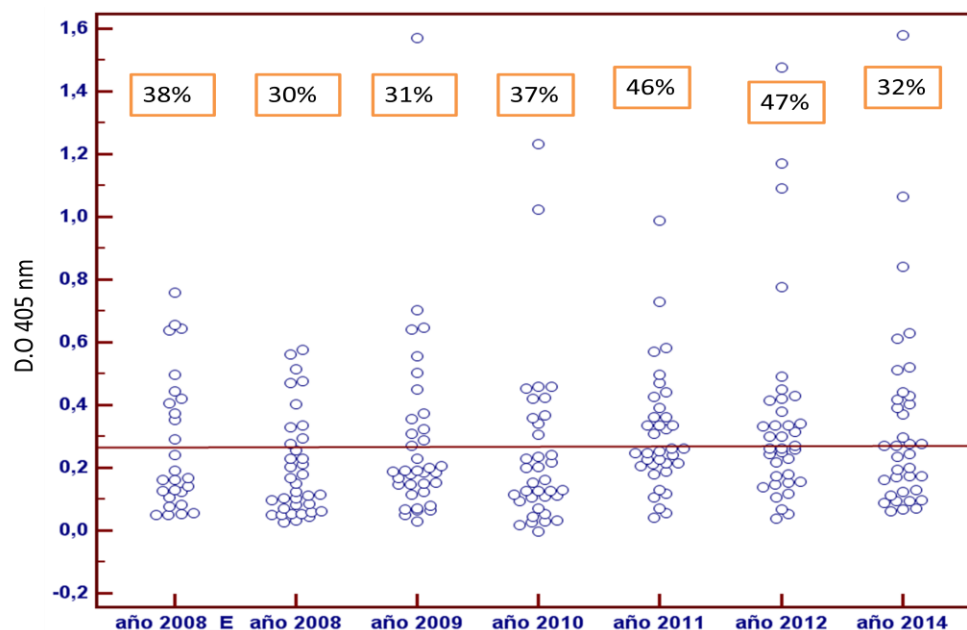


Fig. 12 Prevalencia de anticuerpos anti-β1 adrenérgico durante la evolución de la ECh en Pacientes mayores de 15 años del brote oral de Chacao correspondiente al grupo del estudio longitudinal. Enero del 2008 (n=32), julio 2008, 2009 y 2010 (n=41), Julio 2011 (n=37), julio 2012 (n=32), enero 2014 (n=22)

Se evaluaron 49 pacientes correspondientes al grupo de estudio longitudinal para realizar una correlación de Pearson con respecto a los porcentajes de lisis y la densidad óptica obtenida en la prueba ELISA correspondiente a ese mismo año (Post-tratamiento), para evaluar si existe o no relación entre la persistencia del parasito y la presencia de los anticuerpos anti- β1 adrenérgicos en cada uno de los grupos evaluados.

Para ello se realizó la clasificación de los pacientes en 4 grupos de acuerdo a las densidades ópticas obtenidas en el año 2008 Pre-tratamiento y 2014 Post-tratamiento (Tabla 7).

En las figuras 13, 14, 15 y 16 se puede evidenciar que no existe una relación lineal entre la persistencia del parasito demostrado por la actividad lítica de los sueros y la presencia o no de los anticuerpos anti- β1 adrenérgicos al analizar cada uno de los (r) obtenidos en la correlación de Pearson que varían de $r = 0,021$ y $-0,687$, lo que indican correlaciones positivas o negativas muy bajas en cada uno de los grupos evaluados, por ello la relación entre infección y presencia de anticuerpos anti- β1 adrenérgicos no es indicativo de la instalación de un posible daño cardíaco.

Tabla 7. Condiciones por las cuales los pacientes fueron divididos en cuatro grupos de acuerdo a la presencia o no de anticuerpos anti receptor $\beta 1$ agrenérgico presentes en los años 2008 y 2014

Grupo	Condición		N° pacientes
1	Pre-tratamiento (-)	Post- tratamiento (+)	11
	D.O: 0,179 $\pm$ 0,102	0,606 $\pm$ 0,370	
2	Pre-tratamiento (-)	Post- tratamiento (-)	21
	D.O: 0,098 $\pm$ 0,06	0,166 $\pm$ 0,07	
3	Pre-tratamiento (+)	Post- tratamiento (-)	8
	D.O: 0,456 $\pm$ 0,159	0,142 $\pm$ 0,04	
4	Pre-tratamiento (+)	Post- tratamiento (+)	9
	D.O 0,632 $\pm$ 0,183	0,635 $\pm$ 0,218	

Pre-tratamiento (año 2008)

Post-tratamiento (año 2014)

D.O: Densidad ópticas obtenidas más desviación estándar

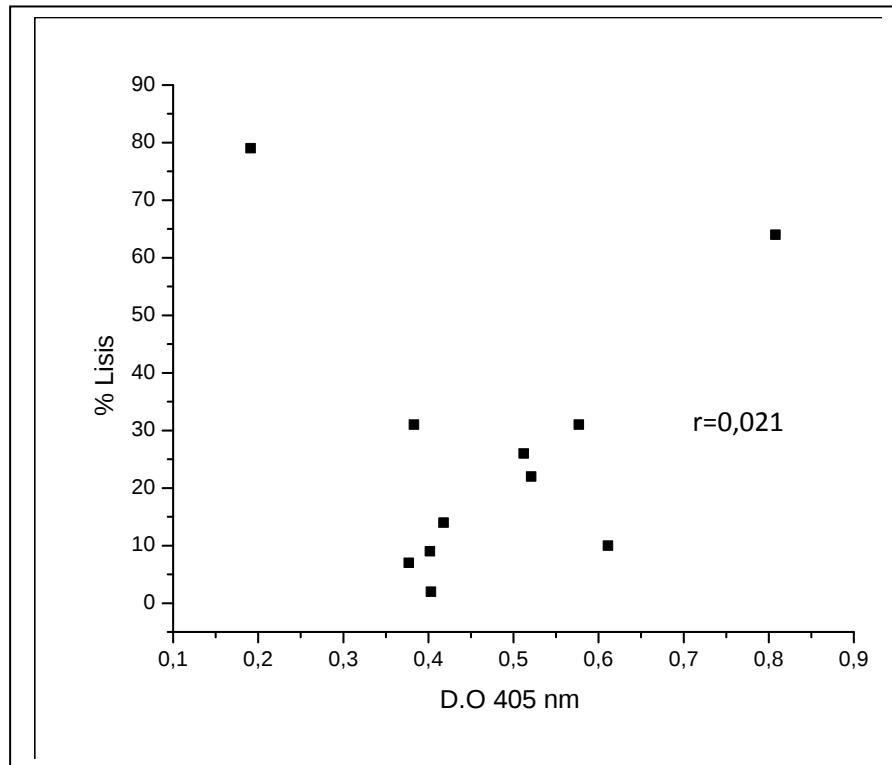


Fig. 13 Grafico de dispersión del grupo 1 negativos en Pre-tratamiento y positivos a Post Tratamiento (n=11), en el cual se muestra un coeficiente de correlación de Pearson ($r= 0,021$), lo cual indica una correlación positiva muy baja entre ambas variables a relacionar.

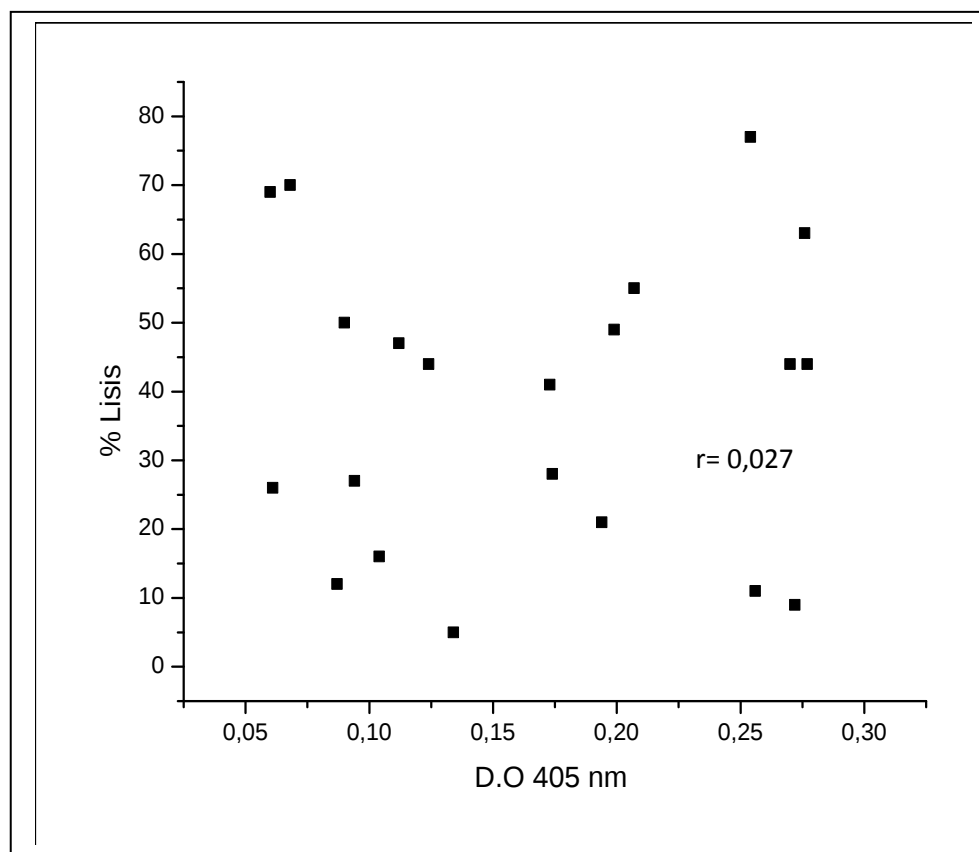


Fig. 14 Grafico de dispersión del grupo 2 Negativos Pre-tratamiento y Post-tratamiento (n=21), en el cual se muestra una muy baja relación entre ambas variables de estudio con un coeficiente de correlación de Pearson de ($r = 0,027$)

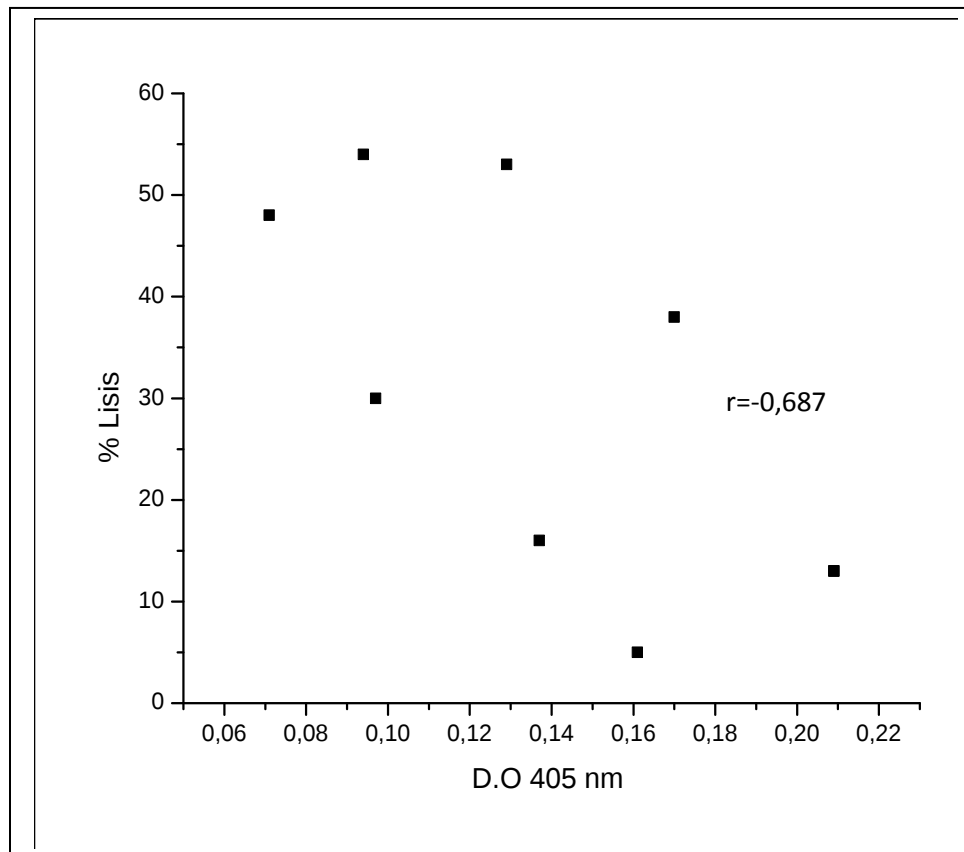


Fig. 15 Grafico de dispersión del grupo 3 correspondiente a positivos Pre-tratamiento y negativos Post-tratamiento (n=8), donde se muestra una correlación negativa moderada en relación a ambas variables de estudio con un coeficiente de correlación de Pearson de ($r = -0,687$)

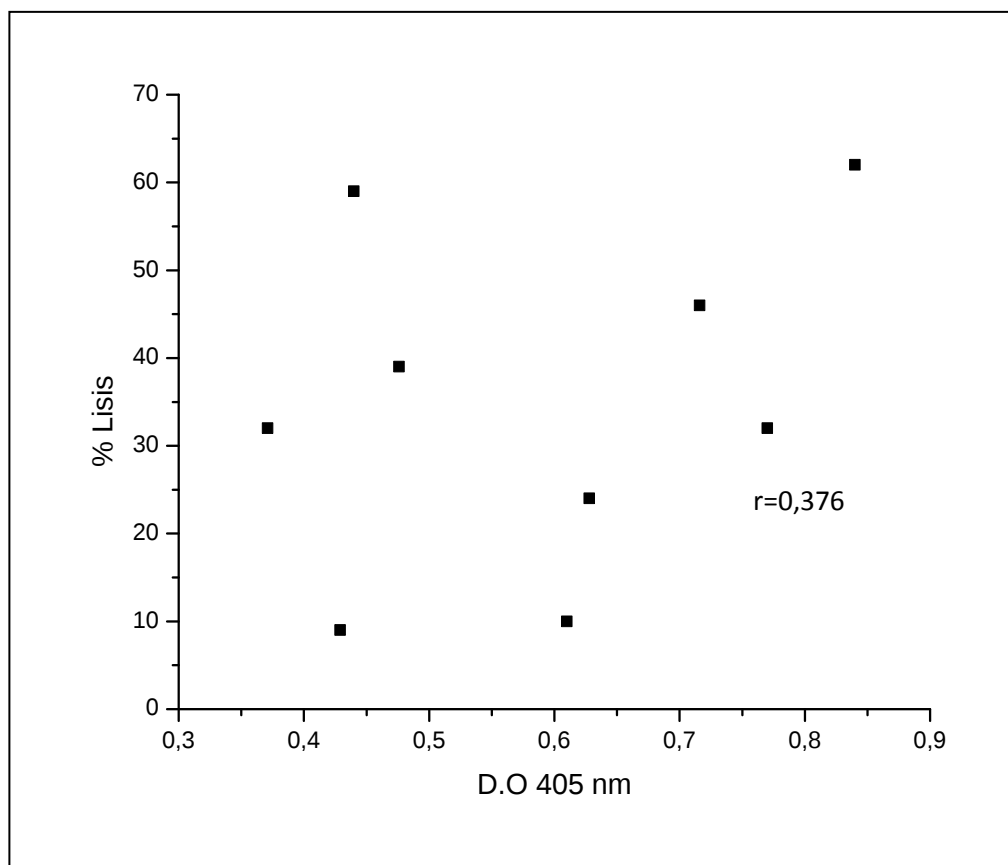


Fig. 16 Grafico de dispersión del grupo 4 positivos Pre-tratamiento y Post-tratamiento (n=9), donde se muestra una correlación negativa moderada en relación a ambas variables de estudio con un coeficiente de correlación de Pearson de (r= 0,376)

7. DISCUSION

En el ámbito clínico existen dudas e incógnitas sobre los mecanismos que intervienen en la evolución de la ECh. Se ha demostrado que los anticuerpos dirigidos contra los receptores $\beta 1$ adrenérgicos causan alteraciones en la actividad de los receptores, y a largo plazo pueden originar el desarrollo de una cardiopatía (Sterin-Borda, 1996). La presencia de los anticuerpos anti- $\beta 1$ adrenérgicos han sido previamente descritas en suero de pacientes con ECh y en animales infectados experimentalmente con *T. cruzi* (Goin, 1991; Mijares 1996; Wallukat, 2000; Daliry, 2013), encontrando una prevalencia mayor en pacientes en fases indeterminadas y crónicas de la enfermedad, situación que ha llevado a evaluar y sugerir la utilidad de estos anticuerpos como marcadores tempranos de pronóstico, para así ayudar a mejorar la predicción de la presencia o ausencia de miocarditis, tal como ha sido propuesto para otras cardiopatías (Ventura, 2009).

La prueba de inmunoensayo enzimático para la detección de anticuerpos anti- $\beta 1$ adrenérgicos es un método relativamente simple que ha permitido establecer la alta prevalencia de estos anticuerpos en diversas enfermedades cardiacas (Goin, 1991, Chiale, 1996; Gimenez, 2002; Talvani, 2006, Calzada, 2009). Las condiciones óptimas y estudios de sensibilidad y especificidad para la realización de esta prueba no han sido definidas con precisión. Sin embargo esto no le resta importancia al ensayo debido a su utilidad práctica.

Trabajos como los de Gimenez, (2002); Wallukat, (2000) y Calzada, (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. En el presente estudio realizamos la estandarización de cada uno de los componentes de la prueba lo cual permitió establecer las condiciones adecuadas para la detección de los anticuerpos anti- $\beta 1$ adrenérgicos.

Se realizó la estandarización del ELISA, empleando sueros controles con alta y baja reactividad obteniéndose 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 Magnuson, (1990), así garantizamos todas las condiciones

óptimas para favorecer la reacción, tomando en cuenta los resultados de Holthoff, (2012), el cual reportó que las niveles de anticuerpos anti- $\beta 1$ adrenérgicos en el suero de pacientes suelen ser muy bajas y con estas concentraciones de antígeno, suero y conjugado facilitamos la reacción.

Chiale, (1994); Talvani, (2006); Magnuson, (1990); Mijares, (1996), reportaron en la metodología empleada diferentes diluciones en un rango de 1/20 a 1/160 del suero de pacientes o animales infectados 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 entre 0,5 $\mu\text{g/ml}$ (Vicco, 2013), 10 $\mu\text{g/ml}$ (Mijares, 1996; Buval, 2005 Talvani, 2006) y 50 $\mu\text{g/ml}$ (Magnuson, 1990), lo mismo sucede con el conjugado que varían no solo en el tipo de conjugado sino en las diluciones que van desde 1/1000 (Chiale, 1994; Mijares, 1996) a 1/20000 (Holthoff, 2012).

Chiale, (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 esta área. Holthoff, (2012), indica que una alta variación de los porcentajes de estos anticuerpos evaluados en una misma enfermedad cardiaca pueden deberse a la falta de una adecuada estandarización ó 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.

La sensibilidad y especificidad del ELISA en las condiciones expuestas obtenidas en el presente estudio fue de 93% y 81% respectivamente, con un índice Kappa de 0,84, se sugiere tomar como premisa que los pacientes seleccionados para la realización de la prueba de validación deben presentar alguna patología cardíaca en la cual se ha descrito la prevalencia de estos anticuerpos, de no tomarse en cuenta, los valores de sensibilidad obtenidos podrían variar con esta técnica.

No han sido descritas pruebas de validación de la prueba ELISA con el péptido de la segunda asa extracelular del receptor $\beta 1$ adrenérgico usado en este trabajo, por lo tanto no podemos realizar comparaciones de sensibilidad y especificidad con otros estudios. Sin

embargo Chiale, (1996); Holthoff, (2012) y Bornholz, (2014), indican que se pueden encontrar falsos positivos en el grupo control afectando la especificidad del ensayo, esto puede deberse a una elección inadecuada de la población donde la edad puede ser un factor que influye en los resultados, aunque al realizar la purificación de los anticuerpos anti- β 1 adrenérgico de los sueros de los pacientes, disminuye la existencia de estos falsos positivos. Es recomendable para realizar las pruebas de validación un aumento en el número de sueros evaluados para sustentar mejor los resultados obtenidos, siendo recomendable el uso de al menos 50 a 100 individuos de cada control (Ochoa, 2012).

Los resultados de este estudio confirman una prevalencia elevada de anticuerpos anti-receptores β 1 adrenérgico en pacientes con ECh (50%) siendo mayor que en individuos con cardiopatías de origen no chagásico (42%), aunque estadísticamente no existen diferencia significativa entre ambos grupos (tabla 6). Estos resultados se asemejan a los obtenidos por Chiale, (1994) y (1996); Rozen, (1996) en los cuales encuentra entre 46,3% a 53% de reactividad; pero difieren con los obtenidos por Wallukat, (2000), quien obtuvo 29 % de prevalencia de estos anticuerpos en el grupo de pacientes con ECh.

En el presente trabajo no se discriminó el tipo de cardiopatía de los pacientes sin ECh, es decir, no se agruparon de acuerdo a si presentaban trastornos de conducción, arritmias ventriculares ó cardiomiopatía dilata por lo que hace difícil su comparación con respecto a otras investigaciones ya que los porcentajes de los anticuerpos varían de acuerdo a cada patología como puede observarse en Gimenez, (2002); Meiller, (2003); Chiale, (1996) y Holthoff, (2012), con porcentajes de reactividad que varían de 13,6 % si presentan trastornos de conducción y entre 31% al 52% con arritmias ventriculares y cardiomiopatía dilatada.

A pesar de las diferencias cuantitativas, el hallazgo de anticuerpos anti-receptores β 1 adrenérgicos en estas patologías sugiere un nexo patogénico donde los anticuerpos pueden intervenir a través de sus peculiares propiedades funcionales.

Los anticuerpos anti-receptores β 1 adrenérgicos inducen cambios morfológicos y funcionales en la actividad de los receptores. Estos desarrollan efectos estimulantes a través de la ruta clásica de señalización de los receptores β 1 adrenérgico, favoreciendo un

aumento del AMPc de manera proporcional a la concentración de anticuerpos dirigidos contra estos receptores (Sterin-Borda, 1986). A medida que aumenta la concentración de AMPc, se produce la activación de la PKA que fosforila los canales de calcio con el consecuente aumento de la concentración de este ion a nivel intracelular. El incremento de las concentraciones de calcio inhiben la activación de las Na^+ / K^+ ATPasa (bomba reguladora de las concentraciones de calcio), generando una disminución de las concentraciones intracelulares de K^+ , alterando la contractibilidad y generación y conducción de los potenciales de acción (Sterin-Borda, 1996), lo cual se traduce en fallas de la respuesta cardíaca mecánica en los pacientes.

Wallukat, (2000) describe que en cultivos de cardiomiocitos de ratas, los anticuerpos anti-receptores producen la activación de los receptores por hasta 6 horas a diferencia de la acción estimuladora de los agonistas clásicos de este receptor como la adrenalina ó epinefrina cuyo efecto estimulador dura 60 min, esto podría ser importante para el desarrollo y mantenimiento de las enfermedades cardíacas.

Estas observaciones sugieren que la activación del receptor provocada por los anticuerpos anti-receptores no produce la inactivación del receptor que normalmente inducen los agonistas, lo que explicaría la persistencia del efecto estimulante.

Al evaluar cada una de las fases de la enfermedad encontramos una alta prevalencia de estos anticuerpos en la fase aguda (86%), fase indeterminada (41%) y en el grupo de pacientes crónicos cardíopatas con ECh (47%), estos resultados concuerdan con los obtenidos por Mijares, (1996) en animales experimentales y varían a los obtenidos por Goin, (1991) quien muestra en pacientes infectados una baja reactividad de estos anticuerpos en la fase aguda y aumenta progresivamente en la fase crónica.

Gimenez, (2002), obtuvo un porcentaje de prevalencia del 59,5% difiriendo de los obtenidos por Talvani, (2006), con 77,1 % de prevalencia de anticuerpos contra el receptor en la etapa indeterminada de la enfermedad.

Los pacientes crónicos con cardiomiopatías y ECh mantienen un porcentaje del 47%, similar al grupo cardíopata sin ECh y semejantes a los porcentajes reportados por Mijares, (1996) y Chiale, (1994) correspondientes a 47,9% y 50% de prevalencia de anticuerpos en

esta fase respectivamente; contrastando a los observados por Gimenez, (2002) y Talvani, (2006), quienes obtuvieron porcentajes que varían del 50% al 80% de prevalencia.

La secuencia de eventos fisiopatológicos que lleva a la generación y actividad funcional de los anticuerpos anti- β 1 adrenérgicos en humanos no ha sido del todo clara. El desarrollo de un alto porcentaje de estos anticuerpos en la etapa temprana de la enfermedad, como los obtenidos en esta investigación pueden deberse al número potencial de componentes antigénicos existentes en la superficie celular o desde el citosol de los miocitos, protegidos contra el sistema inmune en condiciones fisiológicas, son accesibles debido al daño miocárdico producido por el parásito y proceso inflamatorio que conlleva a la apoptosis y necrosis de las células cardíacas. Posteriormente ocurre la liberación y presentación de los auto-antígenos ante el sistema inmune (Jahns, 2006; Hoebeke, 1995).

Mijares y col, (1996) y Daliry, (2013) demuestran en sus estudios que los anticuerpos se desarrollan durante la fase aguda de la infección suponiendo que esto es resultado del mecanismo de mimetismo molecular, manteniéndose hasta la fase crónica de la enfermedad, a diferencia de los estudios realizados por Sterin-Borda, (1999), quien observa que la distribución de los anticuerpos contra los receptores β 1 adrenérgicos en el curso de la ECh experimental varía en función al tiempo post-infección, describiendo una prevalencia de anticuerpos baja en la fase aguda la cual incrementa durante el curso de infección, resultados similares a los obtenidos por Goin, 1991 en el curso de la enfermedad en humanos .

La discrepancia en los resultados podría deberse a la génesis de la respuesta inmune desencadenada por diferentes cepas parasitarias que inducen modificaciones en el curso de la enfermedad (Daliry, 2013). Se desconoce aún si los anticuerpos desarrollan efectos funcionales en todos los pacientes; pero se puede presumir que aquellos pacientes en fase indeterminada con altos valores de DO de anticuerpos pueden ser más propensos a desarrollar una cardiopatía.

Una fuerte activación del sistema inmune ocurre durante la fase aguda de la infección, acompañada por una activación policlonal de linfocitos B y T. Se ha observado en modelos

animales la distribución de isotipos a lo largo del curso de la infección con *T.cruzi* y están caracterizados por IgG2a y IgG2b en ratones y IgG1 en humanos (Brenner, 1997).

Uno de los aportes del presente estudio es la determinación de los anticuerpos $\beta 1$ adrenérgicos en las fases recientes de la infección por *T. cruzi* en el cual encontramos el mayor porcentaje de los grupos estudiados. Magnuson, (1990) supone que el repertorio de células B varía en cada individuo, y que solo un menor porcentaje de la población podrían desarrollar anticuerpos anti $\beta 1$ adrenérgicos que reconocieran epítopes específicos de los receptores $\beta 1$ y $\beta 2$ adrenérgicos.

Gorelik, (1990) para evaluar el papel estos linfocitos en la activación de los receptores $\beta 1$ adrenérgico y M2 muscarínicos realiza la purificación de linfocitos T y B de animales luego de 9 semanas post infección, demostrando que la interacción entre los anticuerpos y la funcionalidad de los receptores dependerán de los tipos y subtipos de linfocitos, donde los receptores $\beta 1$ adrenérgico son estimulados por una población de linfocitos B. Estos resultados difieren de los obtenidos por Bishopric, (1980), quien describe que tanto linfocitos B como los T ejercen un efecto estimulante de estos receptores produciendo una acumulación de AMPc intracelular.

Los resultados obtenidos durante la evolución de la ECh de un grupo de pacientes inicialmente en una fase aguda, concuerdan a los obtenidos en el estudio de las distintas fases de la enfermedad. Hasta donde sabemos, el presente estudio es único en relación a la determinación de los anticuerpos anti- receptores $\beta 1$ adrenérgico en el mismo grupo de pacientes desde que padecieron la fase aguda hasta siete años después. Se evidencia una alta prevalencia de estos anticuerpos en la fase aguda del 35% al 41%, con una disminución a los 2 años siguientes (2009 y 2010) del 27% al 29%, un aumento a los cuatro años (2011) hasta alcanzar la prevalencia de 40% siete años después de la infección cuando los pacientes ya se encuentran en fase crónica.

Se han realizado numerosos estudios que explican cómo es el control inmunológico de la infección causada por *T. cruzi* durante el desarrollo de la enfermedad de Chagas y su papel en la patogénesis de la misma (Brenner, 2002; Kierszembbaum, 1999; Cardoni, 1999). No se han realizado investigaciones a fondo sobre el desarrollo de los anticuerpos $\beta 1$

adrenérgico durante el curso de la enfermedad siendo una gran interrogante. Es posible que el desarrollo de estos anticuerpos ocurre de la misma forma en que se activa el sistema inmunológico contra antígenos propios del parásito, donde inicialmente ocurre una activación de linfocitos policlonales en la fase aguda que dura alrededor de 30 a 90 días, seguido con una disminución de estos en los siguientes dos años a medida que avanza la infección debido al proceso de maduración de la afinidad de los anticuerpos, aunque sugieren que la naturaleza de estos anticuerpos durante todo el curso de la infección son heterófilos, es decir, anticuerpos con muy baja afinidad y que reaccionan a múltiples antígenos (Brener, 1997; Brener, 2002; Minoprio, 1988).

Podemos sugerir que el aumento progresivo de los anticuerpos $\beta 1$ adrenérgicos luego de los dos años post-infección en algunos pacientes se deba al desarrollo y progresión de un daño cardíaco crónico que puede deberse a un efecto estimulante crónico de los anticuerpos $\beta 1$ adrenérgico en la etapa indeterminada en pacientes que no presentan manifestaciones cardíacas aparentes, acompañado de otros factores que podrían aumentar el desarrollo de una cardiomiopatía como la presencia de antecedente genético que aumentan la susceptibilidad del hospedador a la infección por *T. cruzi* y el desarrollo de cardiomiopatías (Girones, 2003; Viotti, 2002; Daliry, 2014; Buvall, 2005).

Animales inmunizados con el péptido $\beta 1$ adrenérgico, desarrollan anticuerpos específicos contra los receptores $\beta 1$ adrenérgicos a partir de la cuarta semana post inmunización, observándose en la octava semana un agrandamiento en el tamaño del corazón, con un aumento significativo del ventrículo izquierdo y diámetro sistólico, consistente con el fenotipo de una cardiomiopatía dilata, también se ha demostrado que los anticuerpos específicos a estos receptores pueden inducir la apoptosis en cardiomiocitos indicando que los anticuerpos $\beta 1$ adrenérgicos estarían involucrados directamente en el desarrollo de diversas patologías cardíacas en animales (Jane y Colaboradores, 2007). De igual forma se ha reportado que al emplear anticuerpos $\beta 1$ adrenérgicos purificados de animales o pacientes infectados con *T. cruzi* inducen bradicardias y bloqueos auriculo-ventriculares en aislados de corazón de ratas sanas, demostrando que estos anticuerpos no solo afectan al músculo cardíaco sino también la electrogenesis y conducción de potenciales en el mismo (Oliveira, 1997).

La persistencia del parásito o componentes antigénicos del mismo en fase crónica de la enfermedad de Chagas ha sido bien documentada al realizar pruebas con alta sensibilidad como PCR ó pruebas de inmunohistoquímica (Bellotti, 1996; Jones, 1993; Añez, 1999). Chiale, (1994) indica que los componentes intracelulares del parásito, tras su destrucción, son capaces de generar y mantener una respuesta inmunológica cruzada, esto explicaría la presencia de los anticuerpos en esta fase de la enfermedad, aunque esta hipótesis no ha sido comprobada, sugiere que se podría correlacionar la presencia de los anticuerpos $\beta 1$ adrenérgico con la existencia de lesiones miocárdicas detectada por procedimientos no invasivos.

Al realizar la correlación de Pearson para evaluar la relación o no entre la persistencia del parásito evaluado por la presencia de anticuerpos lítico (indicador de persistencia parasitaria) y la prevalencia de los anticuerpos $\beta 1$ adrenérgicos, obtuvimos como resultado que no existe relación alguna entre ambas variables estudiadas en los 4 grupos de pacientes pertenecientes al estudio longitudinal, donde podemos sugerir que los mecanismos de auto-reconocimiento inmunitario de tejidos cardiacos, que si bien son desencadenados inicialmente por la infección por *T. cruzi*, una vez establecidos, la presencia del parásito ya no podría ser condición necesaria para el desarrollo y agravamiento de la enfermedad (Brener, 2000), pudiendo ser dos fenómenos separados en el tiempo, aunque sería necesario realizar estudios más detallados donde se realice una correlación seleccionando aquellos pacientes sin presencia del parásito en los últimos años de estudio demostrado por la técnica ELISA y anticuerpos líticos y compararlos con la prevalencia de los anticuerpos $\beta 1$ adrenérgicos correspondiente a esos años, de esta manera se lograría descartar la hipótesis de la necesidad del parásito para mantener la autoinmunidad (Brener, 2000).

8. CONCLUSIONES

1. Las condiciones evaluadas para la estandarización de la prueba ELISA, 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- β 1 adrenérgicos.
2. La prueba ELISA estandarizada y validada en nuestro laboratorio representa una importante herramienta para detectar y evaluar la prevalencia de anticuerpos anti- β 1 adrenérgicos en pacientes con ECh y pacientes con cardiopatías no chagásica con una alta sensibilidad, reproducibilidad y eficiencia.
3. La prueba ELISA mostró una especificidad del 81%, porcentaje que puede ser evaluado, tomándose las consideraciones adecuadas en la selección de los controles negativos.
4. La prevalencia de los anticuerpos anti- β 1 adrenérgicos en pacientes con ECh mostró un porcentaje del 50%, mayor al obtenido en el grupo de pacientes con cardiopatías sin ECh.
5. Al realizar la determinación de la prevalencia de los anticuerpos anti- β 1 adrenérgicos en las distintas fases de la enfermedad, se obtuvo un alto porcentaje de reactividad (86%) en la fase aguda, probablemente vinculado al daño causado en las células del corazón por la presencia del parásito en esta fase de la enfermedad y consecuentemente al desarrollo de anticuerpos policlonales debido a procesos de mimetismo molecular.
6. En la fase crónica reciente la prevalencia de los anticuerpos disminuyen a 27%, posiblemente por el desarrollo de la afinidad de los anticuerpos.
7. Los porcentajes de prevalencia de los anticuerpos anti- β 1 adrenérgicos aumentan progresivamente a medida que evoluciona la enfermedad hasta una cardiopatía crónica con un porcentaje del 47% sugiriendo el desarrollo de un trastorno inmunoregulatorio que podría involucrar a los receptores β 1 adrenérgicos y cuya estimulación sostenida intervendrían en el mecanismo fisiopatológico de la enfermedad cardíaca.
8. Al evaluar la cinética de prevalencia de los anticuerpos anti- β 1 adrenérgicos en pacientes en una fase aguda inicialmente y su evolución en 7 años, observamos el mismo comportamiento obtenido en las distintas fases de la enfermedad.
9. No se obtuvo una correlación lineal entre la persistencia del parásito demostrado indirectamente al evaluar en los pacientes la presencia de anticuerpos líticos y la alta prevalencia de anticuerpos anti- β 1 adrenérgicos.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICA:

- Abrahamsohn, I., Coffman, R. 1995. Cytokine and nitric oxide regulation of the immunosuppression in *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Immunol.* **155**: 3955-3963
- Acquatella, H., Benítez, J., Cataliotti, F., Mendoza, I., Palacios, I., Condado, A.J., Suarez, J.A. y colaboradores. 2000. Avances recientes en miocardiopatía crónica chagásica: Mecanismos autoinmunes y de isquemia miocárdica, activación aguda de Chagas crónico, expectativas de sobrevivencia y procedimientos quirúrgicos. *Gac Méd Caracas.* **108** (2):169-174
- Alarcón de Noya., Diaz, Z., Colmenares, C., Guevara, R., Noya, O. 2010. Enfermedad de Chagas de transmisión oral: vinculación de caso índice con una microepidemia urbana en Venezuela. *Bol Malariol Salud Amb.* **60**: 135-138.
- Añez, N., Crisante, G., Rojas, A., Diaz, N., Añez-Rojas N., Carrasco, H., Parada, H y colaboradores. 2003. La cara oculta de la enfermedad de Chagas en Venezuela. *Bol Malariol Salud Amb.* **43**: 45-57.
- Añez, N., Carrasco, H., Parada, H., Crisante, G., Rojas, A., Fuenmayor, C., Gonzales, N y colaboradores. 1999. Myocardial parasite persistence in chronic chagasic patients. *Am J Trop Med Hyg.* **60** (5): 726-732.
- Añez, N., Atencio, R., Rivero, Z., Bracho, A., Rojas, A., Romero, M., Crisante, G. 2011. Chagas disease inapparent infection in asymptomatic individuals from a Yukpa ethnic community in western Venezuela. *Bol Malariol Salud Amb.* **51**: 167-175
- Añez, N., Crisante G., Rojas A., Dávila D. 2013. Brote de la Enfermedad de Chagas agudo de posible transmisión oral en Mérida, Venezuela. *Bol Malariol Salud Amb.* **53** (1): 1-11.
- Arce, V., Catalina, P., Mallo, F. 2006. Endocrinología. Editorial Universidad de Santiago de Compostela.
- Bracco, M., Stern-Borda, L., Fink, S., Finiasz, M., Borda, E. 1984. Stimulatory effect of lymphocytes from Chagas patients on spontaneously beating rat atria. *Clin. Exp. Immunol.* **55**: 405- 412
- Beaver, J.C., Jung, R. Cupp, E. 2003. Parasitología clínica de Craig. Editorial Masson Doyma. Mexico
- Becerril M. 2008. Parasitología Médica. Editorial McGraw-Hill Interamericana. Segunda edición. México D.F.

- Bellotti, G., Bocchi, E., De Moraes, A., Higuchi, M., Barbero, M., Sosa, E., Esteves, A y colaboradores. 1996. In vivo detection of *Trypanosoma cruzi* antigens in hearts of patients with chronic Chagas heart disease. *Am Heart J*. **131**: 301-307.
- Bishopric, N.H., Cohen, H., Sefkowitz, R. 1980. Beta adrenergic receptors in lymphocyte subpopulation. *J Allergy Clin Immunol*. **65**: 29-34.
- Bonfante, C., Amaro, A., Garcia, M., Mejias, L., Guillen, P., Garcia, R., Álvarez, N y colaboradores. 2007. Epidemiología de la enfermedad de Chagas en el municipio Andrés Bello, Lara, Venezuela: infestación triatómica y seroprevalencia en humanos. *Cad. Saúde pública*. **23**: 1133-1140.
- Bornholz, B., Roggenbuck, D., Jahns, R., Boege, F. 2014. Diagnostic and therapeutic aspect of β 1 adrenergic receptor autoantibodies in human heart disease. *Rev Autoimmun*. **13**: 954-962
- Brener, Z., Andrade, Z., Netto, M. 2000. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. Editorial Guanabara koogan. Segunda edición. Rio de Janeiro.
- Brener, Z., Gazzinelli, R. 1997. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. *Int Arch Allergy Immunol*. **114**: 103-110.
- 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 β 1-adrenergic. *Clin Exp Immunol*. **143**: 209-215
- Calvet, C., Melo, T., Garzoni, L., Oliveira, F., Neto, D., Meirelles, M., Pereira, M. 2012. Current understanding of the *Trypanosoma cruzi* cardiomyocyte interaction. *Front Immunol*. **3**: 1-8.
- 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.
- Cardoni, R., Antuñez, M., Abrani, A. 1999. Respuesta TH1 en la infección experimental con *Trypanosoma cruzi*. *Medicina*. **59**: 84-90.
- Chiale, P.A., Feigelson, E., Levin, M., Elizari, M., Hoebeke, J., Rosenbaum, M. 1994. Anticuerpos antirreceptores β -adrenergicos 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.

Chiale, P.A., Ferrari, I., Mahler, E., Vollazza, M., Levin, M., Elizari, M., Rosen, M. 1999. Prevalencia y efectos funcionales y bioquímicos de los anticuerpos autonómicos cardiacos en pacientes con arritmias ventriculares y disfunción sinusal. *Rev. Argent. Cardiol.* **68**: 399-413.

Cerisola, D., Rabinovich, A., Alvarez, M., Corleto, C.A., Pruneda, J. 1972. Enfermedad de Chagas y la transfusión de sangre. *Bol. Oficina Sanit. Panam.* **73**: 203-221.

Cossio, P.M., Ruben, P., Kreutzer, E., Diez, C., Segal, A., Arana, R.M. 1977. Immunopathologic and morphologic studies in myocardial biopsies. *Am J Pathol.* **86**:533-544.

Daliry, A., Caldas, I., Figueiredo, L., Torres, R., Talvani, A., Bahia, M., Campos, A. 2013. Anti-adrenergic and muscarinic receptor autoantibodies in a canine model of Chagas disease and their modulation by benznidazol. *Int. J. Cardiol.* **170**: 66-67.

Daliry, A., Resende, I., Pereira, P., Ramos, I., Pereira, G., Silvaes, R., Vieira, J y colaboradores. 2014. Levels of circulating anti-muscarinic and anti-adrenergic antibodies and their effect on cardiac arrhythmias and dysautonomia in murine models of Chagas disease. *Parasitology.* **141**: 1769-1778.

Davila, D.,Donis, J., Arata, G., Villaroel, F., Berrueta, L., Salmen,S., Neves, B.2012. Cardiac autonomic control mechanisms in the pathogenesis of Chagas disease. *Interdiscip Perspect Infect Dis.* **2012**: 1-8.

De Souza W., Carvalho T., Santos E. 2010. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. *Moll. Cell. Biol.* **2010**:2-18.

Dias da Silva, V.J., Machado, M.P., Rocha, A.M., Pdilha, R.M., Ramirez, L.E. 2003. Analysis of cardiac autonomic function in hamsters with Chagas disease. *Rev Soc Bras Med Trop.* **36**:11-12.

Dias, J.C. 2006. Notas sobre o *Trypanosoma cruzi* e sus características bio-ecológicas, como agente de enfermedades transmitidas por alimentos. *Rev Soc Bras Méd Trop.* **39**: 370-375.

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.

Elies, R., Ferrari, F., Wallukat, G. 1996. Structural and functional analysis of the B cell epitopes, recognized by antireceptor autoantibodies in patients with Chagas disease. *J. Immunol.* **157**: 4203-4211.

Feliciangeli D. 2009. Control de la enfermedad de Chagas en Venezuela. Logros pasados y retos presentes. *INCI.* **34**:393-399.

Ferrari,I., Levin, M., Wallukat, G., Rozenn,E., Lebesgues, D., Chiale, P., Elizari, M y colaboradores. 1995. Molecular mimicry between the immunodominant ribosomal protein PO of *Trypanosoma cruzi* and a functional epitope on the human/31-Adrenergic Receptor. *J. Exp Med* **182**: 59-65.

Frielle, T., Collins, S., Kiefer, D., Caron, M., Lefkowitz, R., Kobilka, B. 1987. Cloning of the cDNA for the human $\beta 1$ -adrenergic receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **84**: 7920-7924

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.

Girones, N., Fresno, M. 2003. Etiology of Chagas disease myocarditis: autoimmunity, parasite persistence, or both?. *Trends parasitol.* **19**: 19-22.

Goin, J., Borda, E., Segovia, A., Sterin-Borda, L. 1991. Distribution of antibodies against β -adrenoceptors in the course of the human *Trypanosoma cruzi* infection. *Exp. Biol. Med.* **197**:186-192

Gorelik,G., Genaro, A., Sterin-Borda, L ., Gonzales, S., Borda, E. 1990. Antibodies bind and activate β adrenergic and cholinergic lymphocyte receptors in Chagas disease. *Clin Immunol Immunopathol.* **55**: 221-236.

Gutkind, J. 1998. Cell growth control by G protein coupled receptors: from signal transduction. *Oncogene.* **17**: 1331-1342.

Hoare, C. A. 1971. Rationalization of the terminology for the developmental stages of trypanosomatid flagellates. *Med Parazitol (Mosk).* **40**: 307-309.

Hoebeke, J.1995. Autoimmunity against cardiovascular receptors: structural and functional implications. *Rev Argent Cardiol.* **63(3)**:221-230.

Holthoff, H., Zeibig, E., Jhnas, V., Bauer, J., Lohse, M., Käab, S., Claus, S y colaboradores. 2012. Detection of anti- $\beta 1$ -AR autoantibodies in heart failure by a cell-based competition ELISA. *Cirs Res.* **111**: 675-684.

- Iwato, M., Yoshikawa, T., Baba, A., Anzai, T., Mitamura, H., Ogawa, S. 2001. Autoantibodies against the second extracellular loop of β 1- adrenergic receptor predict ventricular tachycardia and sudden death in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J. Am. Coll. Cardiol.* **37**: 418-424.
- Jahns, R., Boivin, V., Lohse, M. 2006. Beta 1 receptor directed autoimmunity as a cause of dilated in rats. *Int. J. Cardiol.* **112**: 7-14.
- Jahns, R., Boivin, V., Siegmund, C., Inselmann, G., Lohse, M.J., Boege, F. 1999. Autoantibodies activating human β 1-adrenergic receptors are associated with reduced cardiac function in chronic heart failure. *Circulation.* **99**: 649-654.
- Jane, D., Altuntas, C., Johnson, J., Yong, S., Wickley, P., Clark, P., Wang, Q y colaboradores. 2007. β 1 adrenergic receptor autoantibodies mediate dilate cardiomyopathy by agonistically inducing cardiomyocyte apoptosis. *Circulation.* **116**: 399-410.
- Jones, E., Colley, D., Toste, S., Lopes, E., Vnencak-jones, C., McCurley, T. 1993. Amplification of a *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. *Am J trop Med Hyg.* **48**: 348-357.
- Kierszenbaum, F. 1999. Chagas disease and the autoimmunity hypothesis. *Clin Microbiol Rev.* **12** (2). 210-213.
- Kuschnir, E., Sgammini, H., Castro, R., Evequoz, C., Ledesma, R., Brunetto, J. 1985. Evaluation of cardiac function by radioisotopic angiography, in patients with chronic Chagas cardiopathy. *Arq Bras Cardiol.* **45**: 249-256.
- Levin, J.M., Hoebeke, J. 2008. Cross talk between anti- β 1-adrenoreceptor antibodies in dilated cardiomyopathy and Chagas heart disease. *Autoimmunity.* **41** (6): 429-433.
- Magnusson, Y., Wallukat, G., Guillet, G.J., Hjalmarson, A., Hoebeke, A. 1991. Functional Analysis of rabbit anti-peptide antibodies which mimic autoantibodies against the β 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 β -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 β 1 adrenergic and M2 muscarinic receptors and regulate calcium channels in isolated cardiomyocytes. *Moll. Cell. Biol.* **163**:107-112.

Minoprio, P., Coutinho, A. 1988. Lymphocyte subpopulations and clonal repertoire participate in immune response to acute *T. cruzi* infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **88**:356-358.

Morales, G., Pino, A. 1987. Parasitología cuantitativa. Editorial Acta Científica Venezolana. Caracas, Venezuela.

MPPS. 2007. Guía para el diagnóstico, manejo y tratamiento de enfermedad de Chagas en fase aguda a nivel de establecimientos de Salud. *VITAE.* **32**: 1-32 <http://vitae.ucv.ve/?module=articulo&rv=33&n=1163> [Consulta : 29/ 12/2014].

Neto-Cunha, E., Duranti, M., Gruber, A., Zingales, B., Messias, I., Stolf, N., Bellotti, G y colaboradores. 1995. Autoimmunity in Chagas disease cardiopathy: Biological relevance of a cardiac myosin-especific epítope crossreactive to an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. *Proc Natl Acad Sci.* **92**: 3541-3545.

Neto, J., Rassi, A. 2009. Actualización sobre la cardiopatía de la enfermedad de Chagas en el primer centenario de su descubrimiento. *Rev Esp Cardiol.* **11**: 1211-1216.

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 depress electrogenesis and conduction in isolated rabbit hearts. *Circulation.* **96**: 2031-2037.

O.M.S. 2008. Enfermedad de Chagas: Control y eliminación. Informe de la Secretaría. Consejo ejecutivo 124ª Reunión Punto 4.14 del orden del día provisional. EB124/17. 27 de noviembre DE 2008; pp 20.

OMS/OPS. 2014. Programa de la OPS/OMS: Enfermedad de Chagas. http://www.WHO.int/topics/Chagas_disease/es [Consulta: 15/4/2015].

OPS. 2009. Guía para vigilancia, prevención, control y manejo clínico de la enfermedad de Chagas aguda transmitida por alimentos. Serie de Manuales Técnicos, 12. Rio de Janeiro: PANAFTOSA-VP/OPAS/OMS. pp. 92.

Palau M. 2000. Relación hospedador-parásito *Trypanosoma cruzi*. *MVZ-Cordoba.* **5**:33-37.

Pifano F. 1960. Algunos aspectos de la Enfermedad de Chagas en Venezuela. *Arch. Venez. Med. Trop y Parasit Méd.* **3**(2): 73-79.

Pinto Dias, J. C. 2000. Evolución del conocimiento epidemiológico y situación epidemiológica actual. En 1º Congreso Virtual de Cardiología (simposio).

Pinto Dias, J. C. 2008. Problems and perspectives for Chagas disease control: in search of a realistic analysis. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **41**(2): 193-196.

Rassi, J.R., Rassi, A., Marin, J.A. 2010. Chagas disease. *Lancet.* **375**: 1388-1402.

Rastrepo, D. 1998. Parasitosis Humana. Tercera edición. Medellín, Colombia.

Recacoechea, M., Rivero A. 1993. Chagas agudo y sus vías de transmisión. *Bol Inf CENETROP* **15**: 1-9.

Ribeiro, M.P., Dias da Silva, J. 2012. Automic neuroimmunomodulation in chagasic cardiomyopathy. *Exp Physiol.* **97.11**: 1151-1160.

Sanz, R. 2011. Los receptores β adrenérgico en la enfermedad cardiovascular. *Hipertens riesgo vasc.* **28** (2): 55-62.

Segovia, A., Andrade, Z.A., Bloom, B.R., Entrada, S., Goodman, H.C., Kierszenbaum, F., Lambert, P.H., 1976. Inmunología de la enfermedad de Chagas. *Bol. Oficina Sanit. Panam.* **80**: 235-253.

Serra, F. 2010. Insuficiencia cardíaca crónica. Editorial Federación Argentina de Cardiología. Tercera edición. Buenos Aires –Argentina.

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.

Sterin-Borda, L., Cantore, M., Pascual, J., Borda, E., Cossio, P., Arana, R., Passeron, S. 1986. Chagasic IgG binds and interacts with cardiac beta adrenoceptor-coupled adenylate cyclase system. *Int J Immunopharmac.* **8**: 581-588.

Sterin-Borda, L., Gorelik, G., Postan, M., Gonzales, S., Borda, E. 1999. Alterations in cardiac beta-adrenergic receptors in Chagasic mice and their association with circulating beta adrenoceptor-related autoantibodies. *Cardiovasc Res.* **41**: 116-125.

Soares, M., Pontes, L., Ribeiro, S. 2001. The pathogenesis of Chagas disease: When autoimmune and parasite-specific immune responses meet. *An. Acad. Bras. Ciens.* **73**: 547-559.

Storino, R., Milei, J. 1994. Enfermedad de Chagas. Editorial Mosby-Doyma. Argentina, Buenos Aires.

Storino, R. 2000. La cara oculta de la enfermedad de Chagas. *Rev Fed Arg Cardiol.* **29**: 31-44.

Storino, R., Jorg, M. 2002. La enfermedad de Chagas en el siglo XXI: consenso para una asignatura pendiente. *Rev. Argent. Cardiol.* **70**: 9-10.

Suárez, B., Hernández M., Duque N., Martinez C., Feliciangeli M. 2004. Conocimientos sobre la enfermedad de Chagas en los Estados Barinas y Portuguesa, Venezuela. *Bol Malariol Salud Amb.* **44**: 109-118.

Talvani, A., Rocha, M., Ribeiro, A., Borda, E., Sterin-Borda, L., Teixeira, M. 2006. Levels of anti-M2 and anti- β 1 autoantibodies do not correlate with the degree of heart dysfunction in Chagas heart disease. *Microbes and infection.* **8**: 2459-2464.

Tachhi, H. 2008. Receptores beta adrenérgicos e insuficiencia cardíaca. *Rev Insuf Cardíaca.* **3**:96-99.

Tarleton, R. 1991. Regulation of immunity in *Trypanosoma cruzi* infection. *Exp Parasitol.* **73**:106-109.

Traviezo L., Bonfante-Garrido R. 2004. Estudio seroepidemiológico de la enfermedad de Chagas en la localidad de Caballito, Municipio Simón Planas, Estado Lara. Venezuela. *Parasitol Latinoam.* **59**: 46-50.

Tosso, A., Vial, F., Galantin, N. 2011. Transmisión de la enfermedad de Chagas por vía oral. *Rev Med Chile.* **139**: 258-266.

Tovar, N.C., Echeverry, M.C., Mora, G. 2009. Presencia de anticuerpos contra neuroreceptores cardiacos de acetilcolina muscarínicos tipo II en pacientes con enfermedad de Chagas e implementación de marcapasos. *Biomédica.* **29**:476-478.

Van Voorhis, W., Schlekewy, L., Trong, H. 1991. Molecular mimicry by *Trypanosoma cruzi*: the F1-160 epitope that mimics mammalian nerve can be mapped to a 12 amino acid peptide. *Proc Natl Acad Sci.* **88**: 5993-5997.

Ventura, J., Blanco, L., Tuñon, J., Muñoz, B., Madrigal, J., Moreno, J., Ceniga, M y col. 2009. Biomarcadores en la medicina cardiovascular. *Rev Esp Cardiol.* **62 (6)**: 677-688

Vicco, M., Pujato, N., Bontempi, I., Rodeles, L., Marcipar, I., Bottasso, O. 2014. β 1 adrenoceptor antagonists increase plasma levels of anti β 2 antibodies and decrease cardiac involvement in chronic progressive chagas heart disease. *Can J Cardiol.* **30**: 332-337.

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., Vigliano, C., Lococo, B., Petti, M., Bertocchi, G., Álvarez, M., Armenti, A. 2002. Indicadores clínicos de progresión de la miocarditis chagásica crónica. *Rev Esp Cardiol.* **58(9)**: 1037-1044.

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.

PÁGINAS WEB

Mendoza, J., Montero, G. 2004. Introducción a la patología. http://www.sld.cu/galeria/pdf/introduccion_a_la_patologia.pdf [Consulta: 21/4/15]

OMS <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/> [Consulta: 1/10/14].

WHO. 2002. Control of Chagas disease: second report of the WHO expert committee.

<http://www.Who.int/iris/handle/10665/42443> [consulta: 11/5/15]

Imagen: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/trypanosomiasisAmericana.htm> [consulta 27 /11/14]

Anexo



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL
"DR. FÉLIX PIFANO"
COMITÉ ÉTICO CIENTÍFICO



Oficio CEC-IMT 04/2015

Caracas, 10 de marzo de 2015

Ciudadanas

Profa. Belkisyolé Alarcon de Noya

Br. Eglys Márquez

Sección de Inmunología

Instituto de Medicina Tropical

Universidad Central de Venezuela

Presente.-

Después de un cordial saludo, nos dirigimos a ustedes en ocasión de informales que luego de haber leído y evaluado las consideraciones bioéticas implicadas en el estudio intitulado **"Biomarcadores de evolución en pacientes con Enfermedad de Chagas: Prevalencia de anticuerpos anti-receptores $\beta 1$ adrenérgicos"**, proyecto de Tesis de Grado de la Bachiller Eglys Márquez, como requisito para recibir el título de Licenciada en Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela, hemos acordado otorgar el AVAL al estudio presentado bajo las siguientes consideraciones, enumeradas y especificadas con fines esencialmente educativos, por tratarse de una estudiante que está en periodo de formación.

En el proyecto se nos informa que este estudio está enmarcado dentro de la línea de investigación de la Sección de Inmunología del Instituto de Medicina Tropical titulada: ***Biomarcadores de evolución en pacientes agudos y crónicos con Enfermedad de Chagas***, coordinado por la Dra. Belkisyolé Alarcón de Noya quien ha sometido a consideración de este comité todas las investigaciones referidas a la enfermedad de Chagas y la revisión de los respectivos formatos de Consentimiento Previa Información a fin de adecuarlos ante la necesidad de incorporar nuevos puntos de interés.

Este estudio busca ampliar el conocimiento sobre la enfermedad de Chagas, su comportamiento y evolución en el ser humano mediante la evaluación cinética de anticuerpos anti receptores $\beta 1$ adrenérgicos en distintas fases de la enfermedad, para determinar su importancia en el avance de la patología cardíaca, consideramos que sus objetivos son pertinentes porque aportarán elementos que contribuyan al adecuado abordaje de la enfermedad.

Fue acatada nuestra sugerencia de ampliar el apartado Bioético donde se incorpore mayor información sobre los aspectos que deben ser considerados en el uso de muestras de sangre de pacientes o sujetos voluntarios que se encuentran almacenadas en Bancos de Sueros, siguiendo las pautas bioéticas nacionales e internacionales que regulan este aspecto y que deben estar plasmadas en el formato de consentimiento Informado.

Por tratarse de una estudiante que está en periodo de formación, fue invitada a asistir a una de nuestras reuniones para conversar sobre todos los aspectos bioéticos a considerar en su proyecto, la importancia de la Ética de la Investigación y la necesidad de que el investigador tenga una formación

Oficio CEC-IMT 03/2015

Página 1



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL
"DR. FÉLIX PIFANO"
COMITÉ ÉTICO CIENTÍFICO



ética, de manera que sus investigaciones sean realizadas apegadas a las normativas bioéticas, y que este aspecto quede plasmado en el Apartado Bioético del estudio y se dé cumplimiento del mismo. También se conversó sobre la importancia del Consentimiento Informado y los elementos que lo conforman. Es de hacer notar, el interés observado por parte de la estudiante respecto al tema.

Como los productos que se esperan obtener de este estudio no tienen en este momento implicación directa para un paciente en particular, sino que busca estandarizar la medición de anticuerpos y determinar seroprevalencia, este Comité considera que no se establece ningún compromiso con el paciente para la entrega de resultados a las personas participantes.

Se evaluó la necesidad de utilizar muestras de suero de los pacientes afectados en el brote de Chagas de Chacao, en su mayoría menores de edad considerada población vulnerable ya que la información que se espera obtener de los objetivos planteados en el estudio podría aportar elementos que optimicen el seguimiento de su enfermedad y favorezcan también a esa población en particular. (Normas CIOMS y COCEVIN).

Las muestras de sangre a ser utilizadas fueron tomadas tras la aplicación de un Consentimiento Informado que fue evaluado y aprobado por este Comité y reúne las condiciones necesarias para cumplir con la normativa bioética nacional e internacional que vela por el respeto a la Dignidad y la Autonomía de los participantes en cuanto a los siguientes aspectos:

- Contiene una introducción o preámbulo que antecede al formulario de consentimiento informado. Éste fue redactado en lenguaje claro y comprensible, evitando la utilización de lenguaje técnico, con el fin de posibilitar la comprensión de la información para la toma de una decisión razonada y libre de presiones externas.
- Manifiesta de manera expresa la voluntad de participar del paciente y un apartado donde el voluntario autoriza o no, que sus muestras de sangre sobrantes sean almacenadas identificadas con un código bajo congelación, para su uso secundario en futuras investigaciones dentro de la misma línea de trabajo, en este caso sobre la Enfermedad de Chagas y que cualquier uso diferente que se plantee, el investigador debe consultar al paciente y someterlo a consideración de un Comité de Bioética.
- Informa sobre el tipo y duración de la participación en el estudio, expresando la posibilidad del retiro sin que esto traiga consecuencias sobre sus derechos como paciente.
- Asegura la confidencialidad de la información suministrada y de la identidad del paciente.
- Enuncia la posibilidad de divulgación de los resultados obtenidos en eventos y publicaciones científicas.
- Informa sobre la gratuidad de las pruebas y la no retribución económica de los voluntarios por su participación.



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL
"DR. FÉLIX PIFANO"
COMITÉ ÉTICO CIENTÍFICO

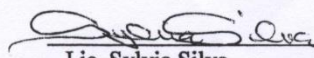


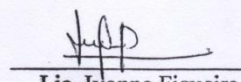
- o Contiene los datos del investigador responsable para poder localizarlo en caso de dudas o deseo de retirarse del estudio
- o Concluye con la declaración del voluntario, cédula, firma y huella, así como la del testigo y del investigador.
- o La elaboración y entrega de una constancia para el voluntario que incluye el nombre del proyecto, la localización física del sitio donde se realiza la investigación y los datos del investigador responsable.

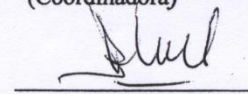
Sin otro particular al cual hacer referencia, se despiden de ustedes:

Atentamente,

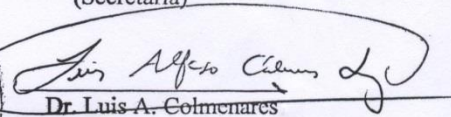
Los miembros del Comité Ético Científico


Lic. Sylvia Silva
(Coordinadora)


Lic. Ivonne Figueira
(Secretaria)

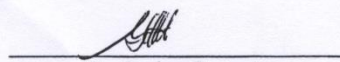

Dr. Alexis Rodríguez A.




Dr. Luis A. Colmenares


Lic. Henry Bermúdez

Abog. Carolina Quiaro *
* actualmente de reposo


Sr. Carlos Guzmán