

Trabajo completo

Chagas crónico: efecto del tratamiento tripanocida sobre los anticuerpos antimuscarínicos

RECIBIDO: 10/10/2014
REVISION: 16/02/2015
ACEPTADO: 29/06/2015

Olivera, L. V. • Bizai, M.L. • Arias, E. E. • Suasnabar, S. M. • Denner, S. G. • Arias E. D. • Fabbro, D. L.

Centro de Investigaciones sobre Endemias Nacionales (CIEN).
Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas (FBCB). Universidad
Nacional del Litoral (UNL). Santa Fe. Argentina. Ciudad Universitaria.
Paraje el Pozo. 3000. Tel: 0342-4575206 Int. 152.
E-mail: dfabbro@fbc.unl.edu.ar

RESUMEN: Los anticuerpos anti-muscarínicos (anti-M2) podrían estar relacionados con alteraciones disautonómicas en la enfermedad de Chagas.

Objetivo: evaluar efecto del tratamiento tripanocida sobre los anticuerpos anti-M2 en adultos chagásicos crónicos seguidos durante 24 años promedio.

Estudio de cohorte retrospectivo.

Infectados crónicos por *T. cruzi* agrupados en: A) 31 tratados con drogas tripanocidas (102 muestras post-tratamiento); B) 36 no tratados (95 muestras). Controles no chagásicos: 17 cardiopatas y 22 sanos. Pacientes tratados: 11/31 (35,5%) inicialmente presentaron reactividad anti-M2; 2/31 (6,4%) permanecieron reactivos durante el estudio. No tratados: 14/36 (38,9%) fueron positivos al inicio y final del seguimiento. Todos los pacientes

permanecieron sin cambio clínicos durante el estudio. Los controles no presentaron reactividad anti-M2.

Los anticuerpos anti-M2 disminuyeron o desaparecieron por efecto del tratamiento tripanocida cuestionando su naturaleza autoinmune. Además, estos anticuerpos no serían de utilidad como marcador pronóstico de evolución clínica.

PALABRAS CLAVES: Enfermedad de Chagas, Tratamiento tripanocida, Anticuerpos antimuscarínicos

SUMMARY: *Chronic Chagas Disease: effect of trypanocidal treatment on antimuscarinic antibodies*

Anti-muscarinic antibodies (anti-M2) could be related to dysautonomic alterations in Chagas disease.

Objective: evaluate effect of trypanocidal treatment on the anti-M2 antibodies in chronic chagasic adults followed for 24 years on average.

Retrospective cohort study. Chronic patients infected by *T. cruzi* were grouped into: A)31 treated with trypanocidal drugs (102 samples post-treatment); B)36 untreated (95 samples). Controls no chagasic: 17 with cardiopathies and 22 healthy.

Patients treated: 11/31(35.5%) initially presented anti-M2 reactivity; 2/31 during the study remained reactive. Untreated: 14/36(38.9%) were positive at the beginning

and to the end of follow up. All patients remained without clinical change during the study. The controls no showed anti-M2 reactivity.

The anti-M2 antibodies declined or disappeared due to the effect of trypanocidal therapy, questioning their autoimmune nature. In addition, these antibodies would not be useful as a prognostic marker of clinical evolution.

KEYWORDS: Chagas disease, Trypanocidal treatment, Anti-muscarinic antibodies

Introducción

La enfermedad de Chagas es producida por un protozooario hemoflagelado, el *Tripanosoma cruzi*. Se estima que se encuentran infectados aproximadamente 8 a 10 millones de personas en el continente americano (1).

En su evolución natural la enfermedad presenta 3 fases: aguda, crónica sin patología demostrada y crónica con patología demostrada. Solo el 25 – 30% de los infectados desarrollan las lesiones del periodo crónico después de 15 o más años de la entrada del parásito al organismo.

Existe controversia sobre los mecanismos causantes de la patología observada durante la fase crónica de esta parasitosis. Numerosos trabajos demostraron compromiso del sistema inmune en el desarrollo de enfermedad (2,3,4,5,6,7,8). Esto condujo a postular el posible carácter autoinmunitario en las lesiones que conducen al desarrollo de patología cardíaca y/o digestiva.

Se han detectado en pacientes chagásicos la presencia de anticuerpos cir-

culantes dirigidos contra receptores colinérgicos muscarínicos del miocardio. Los anticuerpos podrían interactuar con los receptores muscarínicos M2 (predominante en corazón) desencadenando señales intracelulares que generen disautonomía (9,10,11,12,13,14,15).

Sin embargo a pesar de que se han encontrado anticuerpos anti-M2 en infectados con *T. cruzi* no se ha podido aun establecer una relación directa entre su presencia y el desarrollo de patología (16).

Si bien se plantearon mecanismos auto-reactivos como principales responsables del daño cardíaco, otros estudios demostraron una fuerte asociación entre la presencia de ADN de *T. cruzi* y la respuesta inflamatoria en los sitios de lesión (17,18,19).

El desconocimiento de los mecanismos patogénicos en la enfermedad de Chagas, su posible origen autoinmune y la persistencia de la serología reactiva post-tratamiento generaron dudas sobre las pautas terapéuticas a seguir en adultos con infección crónica.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar si el tratamiento tripanocida, administrado en adultos con infección crónica, modifica el nivel de respuesta humoral de los anticuerpos anti-M2.

Materiales y Métodos

- Diseño: estudio de cohorte retrospectivo
- Población: a partir del seguimiento clínico, serológico y parasitológico que se realiza en el CIEN (Centro de Investigaciones sobre Endemias Nacionales), se seleccionaron adultos con infección crónica por *T. cruzi* -sin alteraciones electrocardiográficas ni radiológicas y sin evidencia clínica de miocardiopatía chagásica- que concurren a control bianualmente y tienen un seguimiento promedio de 24 años.

El control clínico consta de ECG de 12 derivaciones y Rx tórax, Ecocardiograma y Holter en los casos que el médico especialista en cardiología lo considere necesario.

Se realiza serología convencional (SC) mediante las siguientes determinaciones:

Aglutinación Directa (AD), Hemaglutinación Indirecta (HAI), Enzimoimmunoensayo (ELISA) e Inmunofluorescencia Indirecta (IFI). A todos los pacientes se les realizan al menos 3 de los test serológicos mencionados.

Para este estudio retrospectivo se seleccionaron muestras de sueros, obtenidas en las diferentes visitas de pacientes adultos con infección crónica, en buen estado de conservación. Se analizaron un promedio de 3 muestras por paciente. La población en estudio se dividió en: GRUPO A) 31 pacientes (102 sueros) que recibieron tratamiento antiparasitario específico; GRUPO B) 36 pacientes no tratados (95 sueros). El tiempo promedio de seguimiento fue de 24 +/- 5 años. Todos los pacientes permanecieron sin manifestaciones clínicas compatibles con cardiopatía chagásica durante el estudio. Los grupos fueron comparables en edad, sexo, factores de riesgo y tiempo de seguimiento, $p > 0,05$. Tabla 1. Se procesaron además controles no chagásicos: 17 pacientes con cardiopatía y 22 personas sanas.

Tabla 1. Población en estudio: sexo, edad, factores de riesgo cardiovascular y tiempo de seguimiento de infectados con *T. cruzi* sin patología demostrada

Grupo	Sexo F/M	Edad ‡	FRC *	Seguimiento (años)
A) Tratados	23 / 8	29.3 ± 8.6	16	25.1 ± 6.6
B) No tratados	24 / 12	32.2 ± 9.8	16	24.1 ± 5.7

‡ Edad al momento de inclusión

*FRC, factores de riesgo cardiovascular, tales como tabaquismo, hipertensión y alcoholismo (La presencia de estos factores de riesgo se define como: tabaquismo, una historia de 10 años de 20 cigarrillos por día; alcoholismo como una ingesta diaria de alcohol de alrededor de 100 mg/día por un periodo mínimo de 10 años e; hipertensión una presión diastólica de 90 mm Hg o mayor).

- Tratamiento:* nifurtimox o benznidazol, según Normas Nacionales al momento de su administración, anterior al año 1984. La dosis y tiempo de tratamiento fueron: nifur-

timox 8-10 mg/kg/día, durante 30-60 días; benznidazol 5 mg/kg/día por 30 días.

- Consideraciones éticas:* Se siguieron los estándares éticos establecidos por el Minis-

terio de Salud de la Nación, la Universidad Nacional de Litoral y las Guías internacionales de regulación para la investigación en humanos. Los pacientes fueron informados de los objetivos del estudio y firmaron su consentimiento para participar del mismo.

•*Conservación de las muestras:* Los sueros se almacenaron en alícuotas, congelados a -20°C y glicerizados con igual volumen de glicerina bufferada. Previo al dosaje de anticuerpos anti-M2 se realizaron al menos dos reacciones serológicas convencionales (HAI, AD, ELISA e IFI), para evaluar estado de conservación. Se consideraron aptas para el estudio las muestras que presentaban un nivel de anticuerpos similar al suero fresco en el momento del chequeo. Además se incluyeron sueros de pacientes que recibieron tratamiento tripanocida y que negativizaron la serología convencional.

•*Determinación de anticuerpos específicos anti-M2:* Los sueros se procesaron empleando un estuche comercial de ELISA (Chagacor, Laboratorios Lemos S.R.L, Buenos Aires, Argentina). Este kit emplea como antígeno péptidos sintéticos cuya secuencia de aminoácidos es idéntica al receptor muscarínico colinérgico. Por lo tanto este ensayo detecta los anticuerpos IgG dirigidos contra estos receptores autonómicos.

•*Análisis estadístico:* se realizó utilizando los softwares Stata 9.1 y Prisma 5.0 (GraphPad, USA). Se aplicaron las pruebas: T de student para muestras dependientes e independientes según correspondiera; Prueba exacta de Fischer; Ecuaciones de Estimación Generalizada (GEE), Test de correlación de Spearman. Se fijó un nivel de significación de $p < 0,05$.

Resultados

En los sueros de los pacientes que recibieron tratamiento (grupo A), la reactividad anti-M2 al inicio del estudio fue 11/31 (35,5%) y la SC 100% reactiva. La evolución de los anticuerpos anti-M2 en las muestras estudiadas a lo largo del tiempo se muestran en la figura 1a. Como se puede ver, 4 pacientes tratados presentaron valores iniciales comprendidos en un rango del 10% alrededor del cut-off, 2 por encima y 2 por debajo. Las lecturas posteriores de estos pacientes fueron todas negativas para anticuerpos anti-M2.

En este grupo de pacientes tratados se observa una disminución de estos anticuerpos a medida que transcurre el tiempo post-tratamiento. Al final del seguimiento solo 2/11 permanecieron positivos para anticuerpos anti-M2: uno presentando una importante caída en la respuesta, cercana al valor de cut-off (1,408 a 0,410 DO, 27 años de seguimiento); y el otro mantuvo un nivel constante de reactividad anti-M2 (0,680 a 0,681 DO, 25 años de seguimiento). Figura 2a.

La comparación de las medias de la respuesta anti-M2, al inicio y al final del seguimiento, mostró una caída significativa en los niveles de dichos anticuerpos (T de student, $p=0,0014$). Al aplicar el modelo GEE, que incluye todas las mediciones realizadas de anticuerpos anti-M2 para cada paciente durante el seguimiento, se obtuvo una caída por efecto del tratamiento ($\Delta=0,195$ DO, $p < 0,05$).

Al final del seguimiento la SC para el grupo A fue: 18 negativizaron, 9 presentaron SC dudosa (débil reactividad en el cut-off para alguno de los test serológicos y no reactivo en otro) y 4 de ellos permanecieron sin cambios. La figura 3 muestra la evolución de la

SC para los pacientes tratados que presentaron reactividad anti-M2 al inicio del estudio.

Para todos los pacientes del grupo B, que no recibieron tratamiento, la SC fue siempre positiva durante el seguimiento. En este grupo 14/36 (38,8%) fueron positivos para anticuerpos anti-M2 en la muestra inicial e igual porcentaje de reactividad se observó al final del estudio. Figura 1b. Un solo paciente presentó lecturas de DO +/- 10% el valor del cut-off, que conservó durante el seguimiento. Otro paciente, disminuyó los títulos hasta un valor "indeterminado" y uno negativizó el test anti-M2. En este grupo, 2 pacientes mostraron seroconversión positiva para Ac anti-M2. El resto presentó variaciones en el nivel de respuesta, siempre con valores por encima del cut-off. Figura 2b. Al comparar las medias de la respuesta anti-M2, al inicio y al final del seguimiento, no se observa-

ron diferencias significativas (T de student, $p=0,7342$).

Los controles no chagásicos analizados, tanto los cardiopatas ($n=17$) como los sanos ($n=22$) no presentaron reactividad anti-M2.

Al inicio del estudio, los grupos tratados y no tratados presentaron similares niveles de respuesta anti-M2 (T de student, $p=0,1892$). Al final del seguimiento las diferencias de reactividad anti-M2 entre ambos grupos fueron significativas (T de student, $p=0,0015$). Esto se puede ver en las lecturas iniciales y finales de las fig 1 a y b.

Cuando se analizó la evolución de los Ac anti-M2 y la SC en los pacientes tratados, mediante el test de correlación de Spearman, no se encontró asociación entre el comportamiento de uno y otro test. Es necesario tener en cuenta el escaso número de pacientes que fueron inicialmente positivos para anti-M2 ($n=11$).

Figura 1.

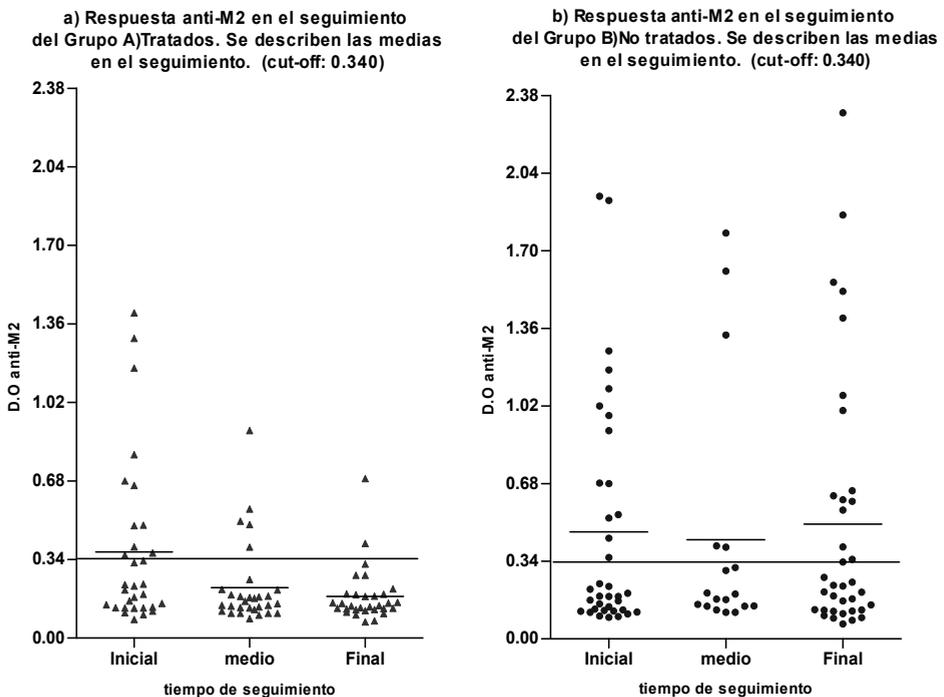


Figura 2.

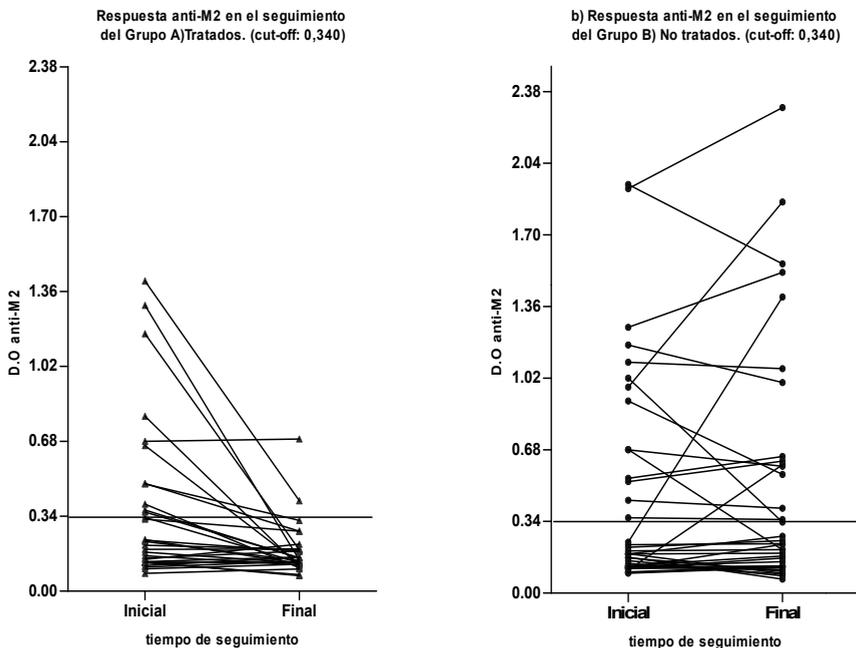
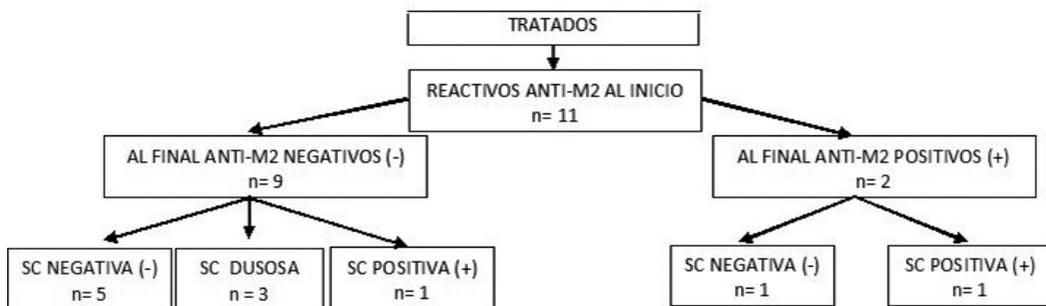


Figura 3. Evolución de la SC y de los anticuerpos anti-M2 en los pacientes tratados, reactivos inicialmente para anti-M2.



Discusión

Los infectados chagásicos crónicos presentaron un nivel de respuesta anti-M2 similar a los hallados por otros investigadores (15,20,21,22,23). La diferencia con esos trabajos radica en el prolongado tiempo de

seguimiento de los pacientes analizados, lo que permitió observar la evolución serológica de los mismos.

Los grupos tratados y no tratados presentaron inicialmente niveles de reactividad anti-M2 semejantes, pero la evolución de los

mismos durante el seguimiento difirió significativamente. La desaparición de los anticuerpos anti-M2 post-tratamiento estaría indicando que la generación de estos no sería de carácter autoinmune, siendo necesaria la presencia del parásito o fracciones antigénicas del mismo para manifestarse (24). Esto se refuerza por la ausencia de anticuerpos anti-M2 en los controles no infectados por *T. cruzi*, tanto en los sanos como en aquellos con cardiopatía de origen no chagásico.

El estímulo que da origen a la formación de los anticuerpos anti-M2 es aún desconocido. La presencia del parásito sería una condición necesaria pero no suficiente ya que estos anticuerpos no se encuentran en todos los infectados por *T. cruzi* (15,20,21,22,23). De los resultados de este trabajo se deduce que su origen difiere de los de la SC ya que si bien ambos anticuerpos disminuyen o desaparecen por efecto del tratamiento, la evolución de los mismos no presentó correlación, mas allá del escaso número de muestras evaluadas.

Por otro lado, los pacientes que no recibieron tratamiento y mantuvieron un nivel constante de anticuerpos anti-M2 durante el seguimiento, no desarrollaron patología demostrable en ese tiempo (24 ± 5 años). Se podría inferir que no necesariamente quien tenga anticuerpos anti-M2 evolucionará hacia la enfermedad.

Más allá de su relativo valor pronóstico, no se puede descartar que la presencia de estos anticuerpos cumpla algún rol en la enfermedad. Se necesitarían estudios complementarios, como los que evalúan alteraciones a nivel del SNA, para conocer las implicancias de los mismos ya que otros trabajos encontraron una asociación entre anticuerpos anti-M2 y disautonomía (12,13,14). Debido al diseño de este tra-

bajo – estudio retrospectivo - no se evaluaron alteraciones autonómicas mediante la prueba de ortostatismo, maniobra de Valsalva, etc, porque no fueron realizadas oportunamente.

Otras investigaciones realizadas en el CIEN (25) demostraron eficacia de la terapia antiparasitaria específica mediante negativización de la SC en 37% de infectados adultos crónicos, observándose además una mejor evolución clínica de los tratados frente a quienes permanecieron sin tratar. Estos resultados coinciden con otras investigaciones (26,27) señalando la importancia del rol del parásito en el desarrollo de patología. Pero sin duda estarían involucrados además factores del huésped (inmunológicos, genéticos, ambientales, etc), que conducirían al desarrollo de algún tipo de patología cardíaca y/digestiva de diferente severidad en 20-30% de los infectados, mientras el resto permanece sin patología toda su vida.

Los resultados más relevantes de este trabajo son: a) la demostración del escaso valor pronóstico de los Ac anti-M2 en el desarrollo de patología y b) la desaparición o disminución de estos anticuerpos por efecto del tratamiento tripanocida indicaría que su origen no es de naturaleza autoinmune.

Agradecimiento

Los autores agradecen al Dr. Jorge Yanovsky –Laboratorio LEMOS– por haber facilitado los equipos para evaluar los anticuerpos anti-M2.

Referencias bibliográficas

1. Organización Panamericana de la Salud. 2006. Estimación cuantitativa de la enfermedad de Chagas en las Américas, Montevideo, 28p

2. Davies JM. 1997. Molecular mimicry: can epitope mimicry induce autoimmune disease? *Immunol Cell Biol.* **75**:113-26
3. Duschak VG, Riarte A, Segura EL, Laucella SA, 2001. Humoral Immune response to cruzipain and cardiac dysfunction in chronic Chagas disease. *Immunol Letters.* **78**:135-142
4. Riveiro Dos Santos R, Mengel JO, Postol E, Soares RAO, Ferreira Fernandez E, Soares MBP y Pontes De Carvalho LC, 2001. A heart-specific CD4- T-cell line obtained from a chronic chagasic mouse induces carditis in heart-immunized mice and rejection of normal heart transplants in the absence of *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunol.* **23**:93-101
5. Girones N, Carrasco-Marin E, Cuervo H, Guerrero NA, Sanoja C and et al, 2007. Role of *Trypanosoma cruzi* autoreactive T cell in the generation of cardiac pathology. *Ann N Y Acad Sci.* **1107**:434-44
6. Engman D, Leon J, 2002. Pathogenesis of Chagas heart disease: role of autoimmunity *Acta Tropical.* **81**:123-132
7. Laguens R, Cabeza Meckert P, Vigliano C, 1999. Patogenia de la miocarditis chagásica crónica humana. *Medicina (Buenos Aires).* **59**:63-8
8. Leon JS, Engman DM, 2003. The significance of autoimmunity in the pathogenesis of chagas heart disease. *Frontiers in Bioscience.* **8**:315-322
9. Goin, J. C., Perez Leiros, C., Borda, E., & Sterin-Borda, L. 1996. Interaccion de autoanticuerpos chagasicos con el tercer dominio extracelular del receptor muscarinico cardiaco humano: implicancias funcionales y patologicas. *Medicina (Buenos Aires).* **56**:699-704
10. Thiers, C. A., Barbosa, J. L., Pereira, B. D. B., Nascimento, E. M. D., Nascimento, J. H. D., Medei, E. H., & Pedrosa, R. C. 2012. Autonomic dysfunction and anti-M2 and anti-β1 receptor antibodies in Chagas disease patients. *Arquivos brasileiros de cardiologia.* **99**:732-739
11. Going JC, Borda ES, Auger S, Storino R, Sterin Borda L., 1999. Cardiac M2 muscarinic cholinceptor activation by human chagásica autoantibodies: association with bradycardia. *Heart.* **82**: 273-278
12. Sterin-Borda Leonor and Borda Enri, 2000. Role of neurotransmitter autoantibodies in the pathogenesis of Chagasic peripheral dysautonomia. *Annals of the New York Academy of Sciences* **917**:273-280
13. Goin J.C., Borda E., Perez Leiros C., Storino R., Sterin-Borda L., 1994. Identification of antibodies with muscarinic cholinergic activity in human Chagas' disease: pathological implications. *Journal of the Autonomic Nervous System.* **47**: 45-52
14. Goin J.C.; Perez Leiros C.; Borda E.; Sterin-Borda L., 1997. Interaction of human chagasic IgG with the second extracellular loop of the human heart muscarinic acetylcholine receptor: functional and pathological implications. *The FASEB Journal.* **11**: 77-83
15. Calzada JE, Garisto J, Zebedes S, Samudio FE, Blandon R, Aviles O, Saldaña A., 2009. Prevalencia de autoanticuerpos contra receptores autonomicos en pacientes panameños con cardiopatía chagásica crónica y con otras formas de cardiopatía. *Biomédica.* **29**:133-139
16. Talvani A, Rocha M, Ribeiro AL, Borda E, Sterin-Borda L, Teixeira M., 2006. Levels of anti-M2 and anti-B1 autoantibodies do not correlate with the degree of heart dysfunction in Chagas' heart disease. *Microbes and Infection.* **8**: 2459-2464
17. Jones, E.M and et al, 1993 Amplification of a *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **48**:348-357
18. Tarleton, R. L., & Zhang, L. 1999. Chagas disease etiology: autoimmunity or parasite persistence?. *Parasitology Today.* **15**:94-99

- 19.** Bestetti, R., Brandariz, S., Schijman, A., Vigliano, C., Viotti, R., & Levin, M. 1996. Role of parasites in the pathogenesis of Chagas' cardiomyopathy. *The Lancet*. **347**:913-914
- 20.** Mitelman J., Gimenez L, Acuña L., Tomasella M., Cicarelli F., Pugliese O., Sturgeon C., Carradori J. 2006. Anticuerpos antirreceptores a neurotransmisores y su correlación con la alteración de la dispersión del QT y de la variabilidad de la frecuencia cardiaca. *REBLAMPA Rev. Bras. Latinoam. marcapasso arritmia*. **19**:155-162
- 21.** Medei E., Pedrosa R.C., Benchimol Barbosa P.R., Costa P.C., Hernández C.C., Chaves, E.A., Linhares V., Masuda M.O., Nascimento J.H., Campos de Carvalho A.C. 2007. Human antibodies with muscarinic activity modulate ventricular repolarization: Basis for electrical disturbance. *International Journal of Cardiology*. **115**: 373-380
- 22.** Gimenez L, Mitelman J, Gonzalez C, Borda E, Sterin-Borda L., 2003. Anticuerpos antireceptores autonómicos, alteraciones de la variabilidad de la frecuencia cardiaca y arritmias en sujetos con enfermedad de Chagas. *Rev. Arg. De Card*. **71**:109-113
- 23.** Mitelman JE, Gimenez LJ. 2008. "Enfermedad de Chagas Mazza en las grandes ciudades". *Roemmers (Buenos Aires) Capitulo V*. 57-62
- 24.** Kierszenbaum F. 2003 Views on the autoimmunity hypothesis for Chagas' disease pathogenesis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol*. **37**:1-11
- 25.** Fabbro DL, Streiger ML, Arias ED, Bizai ML, del Barco ML, Amicone NA., 2007. Trypanicidal treatment among adults with chronic Chagas disease living in Santa Fe city (Argentina), over a mean follow-up of 21 years: parasitological, serological and clinical evolution. *Rev Soc Bras Med Trop*. **40**:1-10
- 26.** Viotti RJ, Vigliano C, Armenti A, Segura EL, 1994. Treatment of chronic Chagas' disease with benznidazole: clinical and serologic evolution of patients with long-term follow-up. *Am Heart J*. **127**: 151-161
- 27.** Viotti RJ, Vigliano C, Lococo B, Bertocchi G, Petti M, Alvarez MG, Postan M, Armenti A, 2006. Long-term cardiac outcomes of treatment chronic Chagas disease with benznidazole versus no treatment: a nonrandomized trial. *Ann Intern Med*. **144**:724-734