

LAS SUBUNIDADES ALFA₄/BETA₂ Y ALFA₇ DEL RECEPTOR COLINÉRGICO NICOTÍNICO CARDÍACO ESTÁN ALTERADAS EN RATAS CON MIOCARDIOPATÍA CHAGÁSICA CRÓNICA.

* Bonfante Cabarcas R.; López Hincapié E.; * Fonseca Zambrano R.; * Ferrer Mancini L.; * Jiménez Hernández E.; * Durand Mena M.; * Rodríguez-Bonfante C. y.

PALABRAS CLAVES: Miocardiopatía chagásica, Receptor Colinérgico Nicotínico, Preparaciones corazón aislado.

RESUMEN

En la Miocardiopatía Chagásica ha sido reportada la presencia de autoanticuerpos contra el Receptor Colinérgico Nicotínico (nAChR), lo cual implicaría la existencia de alteraciones y expresión de estos receptores. Con el objeto de confirmar esta hipótesis se valoró la integridad funcional del nAChR en preparaciones de corazón aislado de 23 ratas Sprague Dawley de 1 a 2 años de edad, divididas en dos grupos: sanas (GS; n=11) y chagásicas crónicas (GCh; n=12), en presencia de Nicotina (NC) a diferentes dosis y antagonistas selectivos de las subunidades α_3/β_4 , α_4/β_2 y α_7 del nAChR: Mecamylamina (MC), Dihydro- β -Eritroidina (DH β E) y α -Bungarotoxina (α -BTX) respectivamente. La administración de NC a bajas dosis (1 μ M) produce bradicardia sostenida en el GS, mientras en el GCh predominó una taquicardia; NC a dosis de 10 y 100 μ M produjo una respuesta bradicardizante seguida de otra taquicardizante en ambos grupos. DH β E 10 nM indujo en GS una taquicardia y una bradicardia en ausencia y presencia de NC 10, respectivamente. α -BTX indujo bradicardia en el GS y bloqueó el efecto de NC 10 μ M en GCh. En conclusión las subunidades α_4/β_2 y α_7 del nAChR tienen una expresión y/o funcionalidad alterada en las ratas con Miocardiopatía Chagásica.

ALFA₄/BETA₂ AND ALFA₇ SUBUNITS OF HEART'S NICOTINIC CHOLINERGIC RECEPTOR IS ALTERED IN RATs WITH CHRONIC CHAGASIC CARDIOMYOPATHY.

KEY WORDS: Chagas cardiomyopathy. Nicotinic cholinergic receptor. Isolating beating heart.

ABSTRACT

In Chagasic cardiomyopathy has been reported the presence of autoantibodies against the nicotinic cholinergic receptor (nAChR), which would imply the existence of alterations in the expression of these receptors. In order to confirm this hypothesis we evaluated the functional integrity of the nAChR in isolated heart preparations of 23 Sprague Dawley rats 1 to 2 years old, divided into two groups: healthy (HG, n = 11) and chagasic (ChG, n = 12) rats, by the administration of nicotine (NC) at different doses and α_3/β_4 , α_4/β_2 and α_7 selective antagonists of the nAChR: Mecamylamine (MC), β -Dihydro-erythroidine (DH β E) and α -bungarotoxin (α -BTX), respectively. The administration of NC at low doses (1 μ M) produces a sustained bradycardia in HG, while a predominant tachycardia in ChG was observed. NC at doses of 10 and 100 μ M produced a bradycardic response followed by a tachycardic in both groups. 10 nM DH β E in HG induced tachycardia and bradycardia in absence and presence of 10 μ M NC, respectively. α -BTX induced bradycardia in HG and blocked the effect of 10 μ M NC in ChG. In conclusion the expression of nAChR's α_4/β_2 and α_7 subunits should be altered in rats with Chagasic cardiomyopathy.

* Unidad de Investigaciones en Parasitología Médica, Unidad de Bioquímica, Decanato de Ciencias de la Salud, UCLA, Barquisimeto, Estado Lara.

INTRODUCCIÓN

La Enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana es causada por un parásito protozoario denominado *Trypanosoma cruzi*, transmitido al hombre por varias especies de insectos hematófagos de la familia *Reduviidae*, subfamilia *Triatominae*. Epidemiológicamente esta enfermedad se extiende desde Sur de los Estados Unidos hasta la Patagonia, por lo que es considerada un problema de salud pública en 21 países de centro y Sudamérica (1). En Venezuela esta antroponosis es considerada de riesgo para aproximadamente 6 millones de personas, que viven principalmente en las áreas rurales con peores condiciones de vida en 198 municipios de 14 entidades federales (2,3). La Miocardiopatía Chagásica es una de las complicaciones más frecuentes de la infección crónica por *T. cruzi*, ya que esta ocurre en aproximadamente el 25-30 % de los pacientes infectados, pudiendo conducir a arritmias de difícil manejo, disfunción cardíaca o muerte súbita (4).

La patogénesis de la Miocardiopatía Chagásica Crónica no está completamente definida, sin embargo existen varias teorías que la podrían explicar, entre las que se encuentra la Teoría Neurogénica que postula cambios miocárdicos producto de la denervación por destrucción mecánica y selectiva de neuronas parasimpáticas postganglionares intracardíacas, causada por el parásito en la fase aguda de la enfermedad, ocasionando un predominio sostenido del sistema autónomo simpático, hecho que iniciaría cambios tróficos que inducirían una remodelación del músculo cardíaco (5). Por otro lado, de acuerdo a la Teoría Inmunogénica se dice que el desarrollo de la Miocardiopatía Chagásica es producto de una respuesta inflamatoria inducida por alteraciones tanto en la inmunidad humoral como en la celular (6). La participación de los fenómenos autoinmunes ha sido discutida por muchos autores, concluyendo que podrían ser resultado de una pérdida de tolerancia a autoantígenos inducida por el *T. cruzi* o de la existencia de un mecanismo de reacción cruzada dirigido a componentes específicos de las células que tengan semejanzas estructurales a un antígeno dado del parásito (mimetismo molecular) (7). Este mecanismo parece estar envuelto en la activación de células T frente al antígeno T. cruzi, lo que altera el control de las células T reguladoras sobre las células T autoreactivas que originan en el

tejido cardíaco infiltrado inflamatorio mononuclear, daño miocárdico y fibrosis (8,9); así como también en la producción de autoanticuerpos por los linfocitos tipo B, los cuales son capaces de interactuar con receptores β -adrenérgicos, Receptor Colinérgico Muscarínico tipo M_2 , Receptor Colinérgico Nicotínico e incluso canales voltaje-dependiente, alterando su funcionalidad (10, 11, 12).

La acetilcolina, principal neurotransmisor de las neuronas preganglionares y postganglionares del Sistema Nervioso Autónomo Parasimpático, es capaz de interactuar con dos grandes grupos de receptores, los muscarínicos y los nicotínicos, llamados así por su gran afinidad a los agonistas Muscarina y Nicotina, respectivamente. Los Receptores Colinérgicos Nicotínicos son canales iónicos activados por ligando y según su localización se clasifican en musculares y neuronales (13). El receptor muscular contiene cuatro subunidades comprendidas en un complejo pentamérico (2α , β , δ , γ o ϵ). Los receptores neuronales se presentan también en forma de pentámeros, compuestos solo por subunidades α y β . En los mamíferos, dentro de las α se describen ocho subtipos (de α_2 hasta α_9) y cuatro subtipos de las β (de β_2 hasta β_5); el número de combinaciones entre ambos subtipos producen una gran variedad de receptores funcionales suficientes para impedir una clasificación farmacológica y funcional adecuada de los receptores (14).

Para establecer una forma de clasificación de los Receptores Colinérgicos Nicotínicos, se realizaron estudios electrofisiológicos que demostraron mediante el uso de agonistas y antagonistas específicos de Receptores Nicotínicos, que por lo menos tres tipos de corrientes nicotínicas pueden ser generadas en neuronas de hipocampo de ratas. Estas corrientes se clasificaron de acuerdo a sus propiedades cinéticas y farmacológicas en las de tipo IA, tipo II y tipo III. La tipo IA se caracteriza por poseer una cinética de activación, desensibilización e inactivación rápida; son altamente sensibles al bloqueo por neurotoxinas como α -Bungarotoxina y la subunidad α_7 del Receptor Nicotínico es la involucrada en la generación de esta corriente. La tipo II se caracteriza por poseer una cinética de activación rápida con una desensibilización relativamente lenta, son sensibles al bloqueo por Dihidro- β -Erythroidina, tienen alta afinidad por acetilcolina y se han relacionado con la subunidad

α_4/β_2 del Receptor Nicotínico. La tipo III se caracteriza por ser sensibles al bloqueo por Mecamylamina y la subunidades del Receptor Nicotínico implicadas en la producción de este tipo de corriente son las α_3/β_4 (15, 16, 17).

Según otras investigaciones, las neuronas ganglionares intracardíacas de ratas pueden expresar las subunidades α_2 hasta α_9 y las subunidades β_2 hasta el β_4 del Receptor Colinérgico Nicotínico, ensamblados de la siguiente manera: α_3/β_2 , α_3/β_4 , $\alpha_3/\beta_2/\beta_4$, $\alpha_3/\beta_2/\alpha_5$, $\alpha_3/\beta_4/\alpha_5$ (18, 19). Además, mediante técnicas farmacológicas y funcionales se demostró que la transmisión a nivel de neuronas ganglionares intracardíacas de caninos es mediada principalmente por Receptores Colinérgicos Nicotínicos que contienen las subunidades del α_3/β_2 con una menor contribución de la subunidad α_7 (20). Estudios posteriores con técnicas electrofisiológicas y PCR, identificaron en neuronas aisladas de tejido ganglionar intracardíaco, una corriente que desensibiliza lentamente, atribuible a Receptores Colinérgicos Nicotínicos que contienen la subunidad α_7 dentro de su composición, lo que plantea que la subunidad α_7 puede generar diferentes tipos de corrientes nicotínicas, dependiendo de su localización (21). Otro estudio reveló que la transmisión ganglionar parasimpática cardíaca inducida por estimulación vagal cervical directa, fue menos efectiva en ratones con delección del gen que codifica para la subunidad α_5 del Receptor Colinérgico Nicotínico. Esto sugiere que la subunidad α_5 modula la actividad del Receptor Colinérgico Nicotínico en el ganglio intracardíaco *in vivo* (22).

El propósito del presente estudio fue analizar la funcionalidad de las diferentes subunidades del Receptor Colinérgico Nicotínico. Para lograr este objetivo se utilizaron preparaciones de corazón aislado de ratas sanas y ratas con Miocardiopatía Chagásica Crónica y así evaluar la acción directa de Nicotina a diferentes dosis y de antagonistas específicos de subunidades del Receptor Colinérgico Nicotínico sobre la frecuencia cardíaca de estas ratas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Modelo Animal: Se utilizaron 23 ratas Sprague Dawley, de ambos sexos con edades comprendidas

entre 1 y 2 años y un peso variable entre 250 y 600 gramos, las cuales fueron escogidas y divididas en forma aleatoria. Se asignaron once ratas al grupo sano y doce ratas con Enfermedad de Chagas en fase crónica al grupo chagásico. Las ratas del grupo chagásico fueron inoculadas a los 3 días del nacimiento con 1000 parásitos/gramo de trypomastigotes sanguícolas de la cepa YBM, obtenidos de la sangre de ratones NMRI infectados.

Corazón aislado: Bajo anestesia con Pentobarbital sódico (20 mg/kg, I.P.) y Ketamina (50mg/kg, I.P.), se realizó una toracotomía mediaesternal para remover rápidamente el corazón y se colocó en solución fisiológica fría. Luego la arteria Aorta fue canulada y acoplada al sistema de perfusión retrograda según lo establecido en el método de Langendorff. La perfusión se inició con solución fisiológica modificada (Glucosa 10 mM, MgSO_4 1 mM, NaCl 116 mM, NaHCO_3 18 mM, CaCl_2 2,5 mM, KCl 5 mM y Malato 1 mM), con una oxigenación de 95% O_2 y 5% CO_2 a un pH entre 7.35 y 7.45, una temperatura de 37° constante y se utilizó una tasa de flujo entre 7 y 10 ml/min necesaria para mantener una presión de perfusión entre 50 y 100 mmHg.

Protocolo Farmacológico: Después de aproximadamente veinte minutos de estabilización de la función cardíaca, se verifica el cumplimiento de los siguientes parámetros para iniciar el protocolo: ritmo sinusal con frecuencia cardíaca mayor o igual a 200 latidos por minuto, ausencia de arritmias y/o trastornos de conducción (no considerada para el grupo chagásico), presión de perfusión entre 50-100 mmHg y flujo continuo de 7 a 10 ml/min. En una primera fase se administró Nicotina en dosis crecientes de 1 μM , 10 μM y 100 μM , cada una de estas soluciones se perfundieron durante 5 minutos, con registros electrocardiográficos continuos y se realizó un lavado con solución fisiológica durante 10 minutos entre cada dosis. En una segunda fase se administró cada antagonista solo durante 10 minutos, realizando un registro electrocardiográfico continuo durante la perfusión, seguidamente se perfundió cada antagonista en asociación con Nicotina 10 μM por 5 minutos continuos, realizándose lavados con solución fisiológica entre cada antagonista durante 10 minutos. Se utilizaron antagonistas selectivos de las subunidades α_3/β_4 , α_4/β_2 y α_7 del Receptor Colinérgico Nicotínico como lo son Mecamylamina (1 μM), Dihydro- β -

Eritroidina (10nM) y α -Bungarotoxina (1nM) respectivamente.

Registro electrocardiográfico: Para realizar el registro electrocardiográfico se utilizaron dos electrodos tipo aguja; el electrodo positivo se ubicó a nivel del ápex y el electrodo negativo a nivel de aurícula derecha; estos electrodos estaban conectados a un bioamplificador (Brigde Amplifier, AD Instruments); que convierte la señal analógica en digital a través de un microprocesador (Power Lab 8SP, AD, Instruments), luego la señal es enviada a un computador a través de un puerto USB, donde se monitorizaron y analizaron los registros electrocardiográficos, por medio del programa Chart4 for Windows.

Análisis de los datos: Los datos obtenidos se presentaron como: promedio más o menos el error estándar ($X \pm \text{SEM}$) y datos porcentuales. La significancia estadística de la diferencia observada entre dos (2) variables se determinó a través de una t-student y se aceptó como significativo un valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Administración de Nicotina: La administración una dosis simple de Nicotina $1\mu\text{M}$ indujo una disminución prolongada de la frecuencia cardiaca en el grupo de ratas sanas, significativamente diferente de la frecuencia cardiaca inicial ($-4,9 \pm 2,1 \%$, $p < 0,05$); mientras que en el grupo con Enfermedad de Chagas indujo una corta bradicardia no significativa, seguida de un aumento significativo de la frecuencia cardiaca ($+2,6 \pm 1 \%$, $p < 0,05$) de mayor duración (Figura 1). Por otro lado al administrar Nicotina $10\mu\text{M}$ se produjo una disminución inicial no significativa de la frecuencia cardiaca ($-2 \pm 1,5 \%$, $p > 0,05$), seguida de un

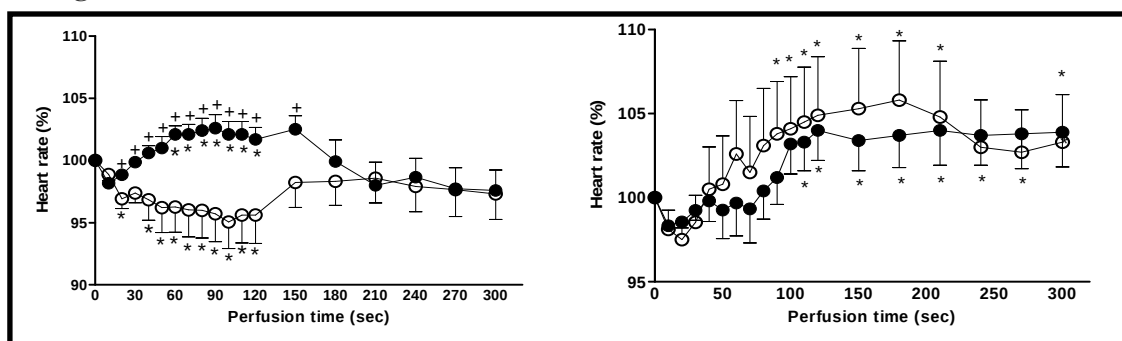
aumento significativo de la frecuencia cardiaca en el grupo sano ($+5,8 \pm 3,5 \%$, $p < 0,05$), también visto en grupo chagásico ($+4 \pm 1,9 \%$, $p < 0,05$) (Figura 2). La administración Nicotina $100\mu\text{M}$ indujo un efecto similar al de $10\mu\text{M}$ en ambos grupos (Datos no mostrados).

Administración de Mecamylamina: En ausencia de Nicotina la administración de Mecamylamina no tuvo efecto sobre la frecuencia cardiaca de nuestras preparaciones (datos no mostrados), mientras que al administrarla en presencia de Nicotina se evidenció que Mecamylamina es capaz de antagonizar el efecto inducido por Nicotina $10 \mu\text{M}$ sobre la frecuencia cardiaca, en ambos grupos (Figura 3).

Administración de Dihydro- β - Erythroidina: Al administrar Dihydro- β - Erythroidina en ausencia de Nicotina se apreció una respuesta taquicardizante significativa en el grupo sano ($+3,2 \pm 1,4 \%$ $p < 0,05$) sin evidenciar respuesta en el grupo chagásico. Con la perfusión retrograda de esta droga en conjunto con Nicotina, se antagonizó el efecto taquicardizante de Nicotina y además se indujo una disminución significativa de la frecuencia cardiaca en el grupo sano ($-5,2 \pm 2,5 \%$ $p < 0,05$), mientras que en el grupo chagásico solo se antagonizó el efecto taquicardizante de Nicotina (Figura 4).

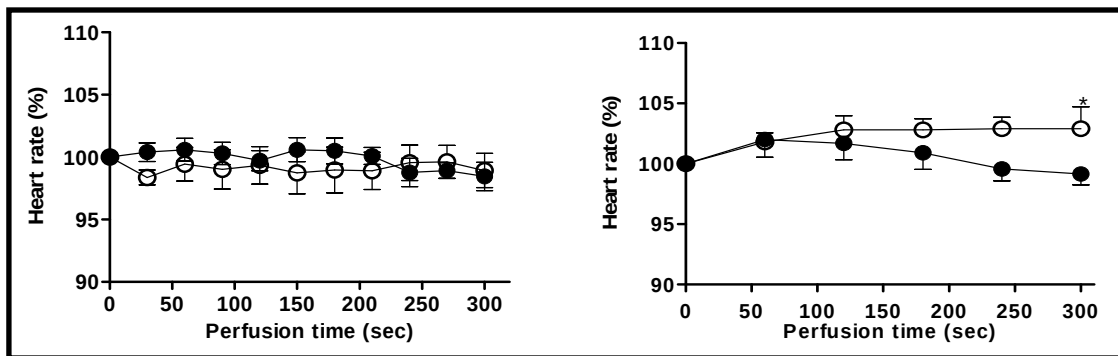
Administración de α -Bungarotoxina: La administración de α -Bungarotoxina en ausencia de Nicotina evidenció una disminución significativa de la frecuencia cardiaca en el grupo sano ($-6,8 \pm 3,1 \%$ $p < 0,05$). En presencia de Nicotina el grupo sano mostró un aumento significativo de la frecuencia cardiaca ($+2,4 \pm 1,2 \%$ $p < 0,05$), mientras que se logró antagonizar el efecto de Nicotina en las ratas chagásicas (Figura 5).

Figura 1.



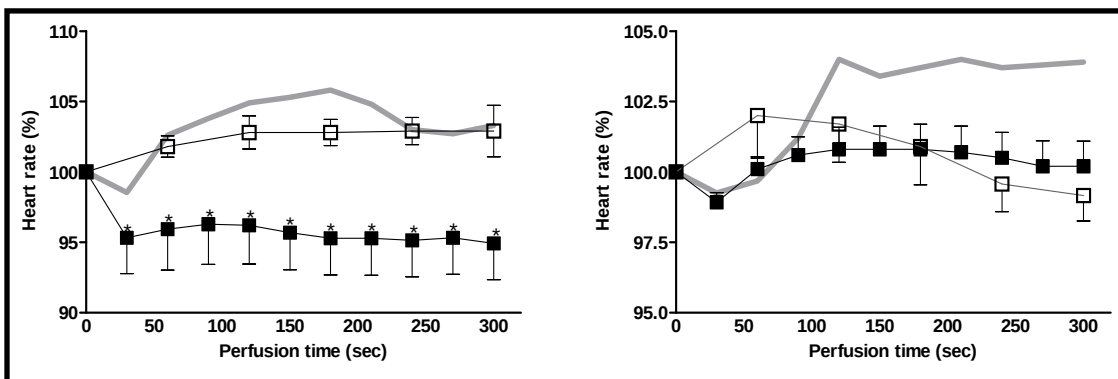
Nicotina induce respuesta bifásica en el corazón aislado de ratas Sprague Dawley. Corazones de ratas sanas y chagásicas se ensayaron en preparaciones aisladas de corazón latiendo espontáneamente tipo Langendorff, con un flujo de perfusión de 70-10 ml/min y una presión de perfusión 50-100 mmHg. La nicotina en concentraciones de 1 μ M (izquierda) y 10 μ M (panel derecho) fue perfundida durante 5 minutos; el registro electrocardiográfico fue tomado en configuración bipolar con una frecuencia de captura de 400 Hz. Observe que nicotina 1 μ M aumenta la frecuencia cardíaca en corazones chagásicos (círculos negros), mientras que en un corazón sano (círculos blancos) redujo la frecuencia cardíaca. La nicotina 10 μ M indujo un efecto bifásico sobre la frecuencia cardíaca, una bradicardia transitoria seguida de una taquicardia sostenida. * significa $p < 0,05$ en comparación con los resultados en ausencia de nicotina (frecuencia cardíaca basal); + significa $p < 0.05$ al comparar la frecuencia cardíaca en ambos grupos durante el tiempo indicado.

Figura 2.



Mecamilamina antagoniza el efecto de la nicotina y no produce ningún efecto cronotrópico por sí misma. 1 μ M de Mecamilamina fue perfundida sola (izquierda), y en presencia de Nicotina 10 μ M (panel derecho) durante 10 y 5 min, respectivamente. Los resultados demostraron que la Mecamilamina no tiene ningún efecto tónico sobre las propiedades cronotrópicas de corazones aislados latiendo espontáneamente de ratas sanas (círculos claros) y de ratas con enfermedad de Chagas. Del mismo modo, Mecamilamina contrarresta la taquicardia inducida por Nicotina (panel derecho). * Significa $p < 0,05$ en comparación con el registro basal pre-droga.

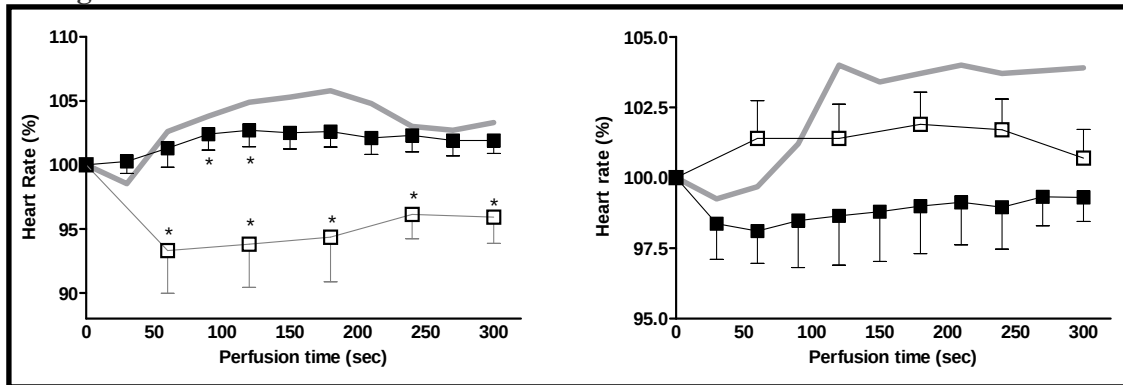
Figura 3.



DH β E antagoniza la taquicardia inducida por Nicotina. Corazones aislados latiendo espontáneamente obtenidos de ratas sanas (panel izquierdo) o de ratas con enfermedad de Chagas (panel derecho), fueron perfundidos con DH β E 10 nM en presencia (símbolos negros) o ausencia (símbolos claros) de la Nicotina 10 μ M. La línea gris continua indica el efecto de la Nicotina 10 μ M en ausencia del antagonista. En los corazones sanos (izquierda), DH β E sola (símbolos claros) no tiene ningún efecto sobre la frecuencia cardíaca, sin

embargo, en presencia de Nicotina (símbolos llenos) DH β E bloquea la taquicardia inducida por la nicotina y provoca una bradicardia. En los corazones chagásicos (panel derecho), DH β E bloquea la taquicardia inducida por la nicotina, sin inducir bradicardia. El porcentaje representa el cambio en el ritmo cardíaco respecto al registro basal pre-tratamiento. * $p < 0,05$ indica un cambio significativo en la frecuencia cardíaca.

Figura 4.



Efecto de α -BGT sobre preparaciones de Langendorff. 1 nM α -BGT fue perfundido en presencia (símbolos negros) o ausencia (símbolos claros) de 10 μ M de Nicotina en corazones sanos (izquierda) o con enfermedad de Chagas (panel derecho), la línea gris continua indica el efecto de nicotina 10 μ M en ausencia del antagonista. En corazones sanos, α -BGT contrarresta parcialmente el efecto de la Nicotina, por el contrario α -BGT solo indujo una bradicardia significativa. En los corazones chagásicos α -BGT, contrarresta el efecto taquicárdico, pero no induce bradicardia cuando es administrado en ausencia del antagonista. * Significa $p < 0,05$ en comparación con los datos obtenidos con la aplicación de la α -BGT en ausencia del antagonista y/o con registro basal pre-droga.

DISCUSIÓN

El protocolo de corazón aislado fue realizado a través del sistema de perfusión miocárdica retrógrada modo Langendorff, modelo que ha demostrado ser válido en este tipo de estudios, ya que permite simular y mantener durante la ejecución de los experimentos las condiciones fisiológicas necesarias para la vitalidad cardíaca.

La idea de que diferentes subunidades del Receptor Colinérgico Nicotínico puedan intervenir en las respuestas opuestas inducidas por Nicotina en preparaciones de corazón aislado ya había sido expuesta por Ji S. y col. (2002), quienes realizaron un estudio donde administraron soluciones de Nicotina a diferentes dosis (1 μ M, 10 μ M, 100 μ M) en preparaciones de corazón aislado de ratas *Sprague Dawley* sanas, evidenciando una disminución inicial seguida por un aumento significativo en la frecuencia cardíaca, que luego disminuyó progresivamente hasta llegar al efecto desensibilizante, sugiriendo que la disminución de la frecuencia cardíaca inducida por Nicotina es mediada por la subunidad α_7 de estos

receptores, los cuales se encuentran situados en las neuronas cardíacas intrínsecas colinérgicas, mientras que el aumento de la frecuencia cardíaca es favorecido por la subunidad β_4 de los Receptores Colinérgicos Nicotínicos, situados en los terminales nerviosos simpáticos y células cardíacas intrínsecas adrenérgicas (23). Los resultados obtenidos en las preparaciones de corazón aislado realizadas en este estudio evidenciaron que al administrar Nicotina a dosis bajas, sólo se produce la fase bradicardizante en lo que concierne a las ratas sanas, mientras que las ratas con Enfermedad de Chagas presentaron una disminución inicial seguida por un aumento de la frecuencia cardíaca, similar a la obtenida por Ji S. y col. Por otro lado al aumentar las dosis de Nicotina a 10 μ M y 100 μ M se produjo este mismo efecto bifásico en ambos grupos. Esto permite sugerir que en las ratas con Enfermedad de Chagas existe una mayor sensibilidad a Nicotina de los Receptores Nicotínicos que expresan las subunidades involucradas en la fase taquicardizante, entre las que se encuentra la subunidad β_4 .

En el mismo orden de lo expuesto por Ji y col. (2002) en cuanto al papel de la subunidad β_4 en las preparaciones de corazón aislado, esta investigación reportó que la administración de Mecamylamina 1 μ M antagonizó el efecto taquicardizante de Nicotina en ambos grupos, demostrando que las subunidades α_3/β_4 están involucradas en el incremento de la frecuencia cardíaca inducida por Nicotina y que su funcionalidad no está alterada en las ratas con Miocardiopatía Chagásica.

Albuquerque y col. (1993) demostraron que en neuronas de hipocampo de ratas era generadas corrientes nicotínicas, una de ellas llamada tipo II se caracteriza por poseer una cinética de activación rápida con una desensibilización relativamente lenta, ser sensibles al bloqueo por Dihydro- β -Erihtroidina, tener una alta afinidad por Acetilcolina y se han relacionado con la subunidad α_4/β_2 del Receptor Nicotínico (16, 17, 18). En nuestro estudio la administración sola de Dihydro- β -Erihtroidina indujo una taquicardia en el grupo sano mientras que en el grupo chagásico no hubo respuesta, lo que sugiere la presencia de subunidades α_4/β_2 sensible a Acetilcolina y que están involucradas en el mantenimiento del tono parasimpático intrínseco, las cuales están alteradas o ausentes en las ratas con Enfermedad de Chagas. Este mismo antagonista asociado a Nicotina indujo un bloqueo de la fase taquicardizante en ambos grupos pero además generó una bradicardia en el grupo sano. Indicando esto 1) la presencia de Receptores Nicotínicos conformados por subunidades α_4/β_2 sensibles a Nicotina en las terminales nerviosas simpáticas, los cuales aumentan el tono adrenérgico, 2) una menor sensibilidad de estos receptores al bloqueo por Dihydro- β -Erihtroidina en las ratas chagásicas y 3) una funcionalidad alterada del Receptor Nicotínico conformado por subunidades α_7 en las ratas con Enfermedad de Chagas.

Otro estudio hecho por Bibevski (2000), demostró que la subunidad α_7 y otros tipos de subunidades de Receptores Colinérgicos Nicotínicos están expresados en neuronas parasimpáticas cardíacas caninas, y que su transmisión ganglionar podría ser bloqueada por α -Bungarotoxina, antagonista específico de la subunidad α_7 (24). Ji S. y col. también realizaron estudios para demostrar si las subunidades α_7 y otros tipos de subunidades de Receptores Colinérgicos Nicotínicos, son capaces de

regular la frecuencia cardíaca; para ello usaron una perfusión continua de 5 minutos con Nicotina y posteriormente α -Bungarotoxina; obteniendo que la disminución inicial de la frecuencia cardíaca inducida por Nicotina fue bloqueada selectivamente por α -Bungarotoxina, pero esta no bloquea el aumento máximo de la frecuencia cardíaca inducida por Nicotina (23). En nuestros resultados se observó que α -Bungarotoxina en ausencia de Nicotina causó una bradicardia en el grupo sano y en el grupo chagásico no hubo respuesta. Esto sugiere la localización de Receptores Nicotínicos con subunidades α_7 a nivel de las terminales nerviosas simpáticas que favorecen el tono adrenérgico intrínseco, estas subunidades podrían estar alteradas o ausentes en las ratas chagásicas. Sin embargo α -Bungarotoxina fue capaz de antagonizar los dos efectos de Nicotina sobre la frecuencia cardíaca en el grupo chagásico y solo bloqueó el efecto bradicardizante en el grupo sano. Esto sugiere que la subunidad α_7 del Receptor Nicotínico podría mediar tanto la fase de bradicardia inicial como la de taquicardia siguiente inducida por Nicotina en las ratas con Enfermedad de Chagas.

En conclusión nuestros resultados proveen claras evidencias de que las subunidades α_4/β_2 y α_7 de los Receptores Colinérgicos Nicotínicos tienen una expresión y/o funcionalidad alterada en los corazones de ratas con Enfermedad de Chagas, lo cual podría estar en relación con la presencia de autoanticuerpos circulantes contra estos receptores descritos por los que apoyan la Teoría Inmunogénica, por lo que recomendamos realizar estudios de PCR para evaluar la expresión de estos receptores y técnicas de inmunoensayos (ELISA) para comprobar la presencia de estos anticuerpos. Así, estos estudios y el nuestro podrían ayudar en la identificación de los posibles mecanismos fisiopatológicos involucrados en el desarrollo de la Miocardiopatía Chagásica.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue financiado por el “Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico” de la “Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado” (Barquisimeto, Lara, Venezuela) proyecto No 002-ME-2005.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. MONCAYO A. Chagas' disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the southern cone countries. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 2003; 98: 577 – 591.
2. Situación de Salud OPS-OMS Venezuela. <http://www.ops-oms.org.ve/site/venezuela/ven-sit-salud-nuevo.htm> (Accedido: 17 de Septiembre del 2007).
3. AÑEZ N, CRISANTE G, ROJAS A, DÍAZ N, AÑEZ-ROJAS N, CARRASCO H, PARADA H, AGUILERA M, MORENO G, GALÍNDEZ-GIRÓN I, SANDOVAL R, SANDOVAL I, VÁSQUEZ L, NAVA-RULO O, GUERRA F, UZCÁTEGUI G, YÉPEZ J, RODRIGUEZ C, BONFANTE-CABARCAS R. La cara oculta de la enfermedad de Chagas de Venezuela. Boletín de Malariología y Salud Ambiental. 63: 45 – 57. 2003.
4. SCHMUNIS GA. American Tripanosomiasis as a public health probchagasic IgGs, is expected. In the present report we used lem. In: Chagas' disease and the nervous system. Scientific publiNMS as ligand and porcine atria or transfected CHO cell cation 547, Washington, DC: Pan-American Health Organization, membranes (results not shown) as M -mAChR source. Our 1994, pp. 3 – 31.
5. AÑEZ N, CARRASCO H, PARADA H, CRISANTE G, ROJAS A, FUENMAYOR C. Myocardial parasite persistence in chronic chagasic patients. Am J Trop Med Hyg; 60: 726 – 732, 1999.
6. FERNANDO E., VIGLIANO C., LAGUENS R., LEVIN M., and BEREK C. analysis of the presence of trypanosoma cruzi in the heart tissue of three patients with chronic chagas' heart disease am. j. trop. med. hyg., 68(2), 2003, pp. 242 – 247.
7. MILEI J, STORNINO R, JORG M, CHIALE P, SCHETJMAN D, STERIN-BORDA L, et al. Patogenia. En: Storino R, Milei J, editores. Enfermedad de Chagas. Buenos Aires: Editorial Doyma Argentina S.A.; 1994.p. 103 – 128.
8. CUNHA-NETO E, COELHO V, GUILHERME L, FIORELLI A, STOLF N, KALIL J, 1996. Autoimmunity in Chagas' disease. Identification of cardiac myosin-B13 *Trypanosoma cruzi* protein crossreactive T cell clones in heart lesions of a chronic Chagas' cardiomyopathy patient. J Clin Invest 98: 1709 – 1712.
9. SHEVACH, H. Regulatory T cells in autoimmunity. Annu Rev Immunol. 18: 423 – 449. 2000.
10. STERIN-BORDA L, BORDA E. Role of neurotransmitter autoantibodies in the pathogenesis of chagasic peripheral dysautonomia. Ann N Y Acad Sci. 917: 273 – 80. 2000.
11. GOIN JC, VENERA G, BISCOGLIO DE JIMENEZ BONINO M, STERIN-BORDA L. Circulating antibodies against nicotinic acetylcholine receptors in chagasic patients. Clin Exp Immunol. 110: 219 – 225. 1997.
12. BORDA E, PASCUAL J, COSSIO P, DE LA VEGA M, ARANA R, STERIN-BORDA L, 1984. A circulating IgG in Chagas' disease which binds to beta-adrenoceptors of myocardium and modulates their activity. Clin Exp Immunol 57: 679 – 686.
13. TAYLOR P. Agentes que actúan en la unión neuromuscular y en los ganglios autónomos. En Goodman E Gilman Las bases farmacológicas de la terapéutica. Editores Brunton L, Lazo J, Parker K. Undécima edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana. Colombia. Pág. 217 – 236, 2006.
14. SARGENT P. The diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptor. Annu. Rev. Neurosci; 16: 403 – 433, 1993.
15. ALKONDON, M. y ALBUQUERQUE, E. Diversity of nicotinic acetylcholine receptors in rat hippocampal neurons: Pharmacological and functional evidence for distinct structural subtypes. J. Pharmacol. 265: 1455 – 1473, 1993.

16. CASTRO, N. & ALBUQUERQUE, E. Brief-lifetime, fast inactivating ion channels account for the α -bungarotoxin-sensitive nicotinic response in hippocampal neurons. *Neurosci.* 164: 137 – 140, 1993.
17. ALBUQUERQUE, E., PEREIRA, E., CASTRO, N., ALKONDON M., REINHARDT, S., SCHRÖDER, H. & MAELIKE, A. Nicotinic Receptor Function in the mammalian central nervous **system**. *Annals New York Academic of Sciences.* 757: 48 – 72, 1995.
18. POTH K., NUTTER T., CUEVAS J., PARKER M., ADAMS D. y LUETJE C. Heterogeneity of nicotinic receptor class and subunit mRNA expression among individual parasympathetic neurons from rat intracardiac ganglia. *J Neurosci.* 2: 586 – 96, 1997.
19. PATRICK J., SEQUELA P., VERNINO S., AMADOR M., LUETJE C. y DANI J. Functional diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Brain Res.* 98: 113 – 120, 1993.
20. BIBEVSKI S., ZHOU Y., MCINTOSH M., ZIGMOND R. y DUNLAP M. Functional nicotinic acetylcholine receptors that mediate ganglionic transmission in cardiac parasympathetic neurons. *J Neurosci.* 13: 5076 – 5082, 2000.
21. CUEVAS J. and BERG D. Mammalian nicotinic receptor with alpha 7 subunits that slowly desensitize and rapidly recover from alpha-bungarotoxin blockade. *J Neurosci*; 18: 10335 – 10344, 1998.
22. WANG N, ORR-URTREGER A , CHAPMAN J, RABINOWITZ R, NACHMAN R, KORCZYN A.D. Autonomic function in mice lacking $\alpha 5$ neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit. *Journal of Physiology.* 542: 347 – 354, 2001.
23. JI S, TOSAKA T, WHITFIELD B, KATCHAMAN A, KANDIL A, KNOLLMANN B, EBERT S. Differential Rate Responses to Nicotine in Rat Heart: Evidence for Two Classes of Nicotinic Receptors. *The journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2002; 301: 893 – 899.
24. BIBEVSKI S., ZHOU Y., MCINTOSH M., ZIGMOND R. y DUNLAP M. Functional nicotinic acetylcholine receptors that mediate ganglionic transmission in cardiac parasympathetic neurons. *J Neurosci.* 13: 5076 – 5082, 2000.