

RESPUESTA DE LAS CELULAS MUSCULARES CARDIACAS A LA INFECCION CON *TRYPANOSOMA CRUZI*

MIRIAM POSTAN¹, MARIA ROSA ARNAIZ², LAURA E. FICHERA¹

*Instituto Nacional de Parasitología Dr. Mario Fatała Chaben,
 Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud (ANLIS), Buenos Aires*

Resumen El objetivo de este estudio es determinar la capacidad de respuesta de la célula muscular cardíaca a la infección por *Trypanosoma cruzi*. Se investigó el rol de la multiplicación de las células musculares en la remodelación cardíaca, y su capacidad de producción de óxido nítrico y control del parasitismo intracelular. Para ello, se determinó la presencia del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) en los miocitos cardíacos de ratas Wistar infectadas experimentalmente con *T. cruzi*, determinándose un aumento significativo del número de núcleos PCNA+ en los animales infectados agudos y crónicos. La capacidad de control del parasitismo intracelular y de producción de óxido nítrico fueron evaluados en cultivos primarios de miocitos cardíacos de ratas neonatas, estimulados con citoquinas *in vitro*. El análisis del parasitismo mostró que el número de miocitos cardíacos con amastigotes intracelulares fue menor en los cultivos estimulados con IL-1 β , TNF- α e IFN- γ . La producción de óxido nítrico fue mayor en los sobrenadantes de los cultivos celulares estimulados con citoquinas, tanto en los infectados como en los controles. Estos datos demuestran que la célula muscular cardíaca participa activamente en la respuesta del organismo durante la infección con *T. cruzi*.

Abstract *Myocardial cell response to Trypanosoma cruzi infection.* The aim of this study is to establish the response of cardiac myocytes to the infection with *Trypanosoma cruzi*. The role of myocardial cell proliferation on heart remodeling and the ability of these cells to produce nitric oxide and control intracellular parasite growth during *T. cruzi* infection were evaluated. The presence of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) was determined in myocardial cells of Wistar rats infected with *T. cruzi*, resulting in a significant increase of PCNA+ labelling in all stages of disease. The ability of myocardial cells to control growth of intracellular parasites and the production of nitric oxide were evaluated in cultures of cardiac myocytes obtained from neonatal rats. Different combinations of cytokines were added to culture media. The number of cardiac cells displaying intracellular amastigotes was lower in cultures supplemented with IL-1 β , TNF- α and IFN- γ than with other cytokine combinations and controls. The addition of cytokines resulted also in an increase of nitric oxide production in both infected and non-infected controls. These results demonstrate that myocardial cells participate actively in the response of the heart to the infection with *T. cruzi*.

Key words: cardiac myocytes, cardiac cell proliferation, *Trypanosoma cruzi*, nitric oxide, Chagas disease

Una de las manifestaciones más importantes de la enfermedad de Chagas es el desarrollo de miocarditis aguda y crónica, con alteraciones electrocardiográficas e insuficiencia cardíaca progresivas e irreversibles^{1,2}. El corazón aumenta generalmente de tamaño y a nivel histológico se observa degeneración y necrosis de fibras musculares cardíacas, infiltrados inflamatorios focales o difusos y fibrosis intersticial de variable intensidad¹⁻⁵.

La patogenia de la miocarditis chagásica no es conocida aún en su totalidad⁶⁻¹⁰. La mayoría de las investigaciones sobre la misma se focalizaron en el estudio del parásito y del sistema inmune del huésped en relación a la intensidad de la infección y al desarrollo de la enfermedad. La detección constante del *Trypanosoma cruzi* en los tejidos de los pacientes chagásicos crónicos indica el rol determinante que tiene el parásito en el desarrollo de las lesiones cardíacas^{11,12}. Estudios experimentales han demostrado que el *T. cruzi* es una especie heterogénea, y que tanto el parasitismo intracelular como el desarrollo de lesiones inflamatorias a nivel del corazón dependen del aislamiento parasitario^{13,14}. Por otro lado, también se ha demostrado que el sistema inmune del huésped es un factor importante en el desarrollo de la miocarditis chagásica. La presencia predominante de

¹ Miembro de la Carrera del Investigador del CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas);

² Becaria del CONICET

linfocitos T en los infiltrados inflamatorios cardíacos y la mayor susceptibilidad al *T. cruzi* de animales experimentales con funcionalidad deficitaria de estas células indican la importancia de las mismas en el resultado de la infección^{4,15-17}.

El *T. cruzi* es capaz de infectar y multiplicarse dentro de la célula muscular cardíaca, entre otros tipos celulares, donde es frecuentemente detectado en todas las etapas de la enfermedad. Es a éste nivel donde ocurren los cambios morfológicos característicos de la miocarditis chagásica, tales como la necrosis celular, la inflamación y el incremento de la masa muscular cardíaca. El conocimiento de la respuesta del tejido miocárdico a la presencia local del parásito y a la inflamación que ésta genera en los tejidos es escaso.

Durante mucho tiempo se ha mantenido el concepto dogmático de que las células musculares cardíacas eran células maduras de diferenciación terminal, y que su multiplicación cesaba poco tiempo después del nacimiento. Este criterio, sustentado en las observaciones clásicas de la histología cardíaca, tiene las limitaciones propias de esa tecnología. El desarrollo de técnicas de mayor complejidad para la identificación de la actividad mitótica, ha permitido demostrar la capacidad proliferativa de los miocitos cardíacos, principalmente en cardiopatías isquémicas e idiopática dilatada¹⁸⁻²⁰. También se ha demostrado que los miocitos cardíacos de individuos normales pueden proliferar, aunque con menor frecuencia que en las patologías anteriormente mencionadas. Es posible que los mecanismos de remodelación miocárdica

descritos en otras entidades nosológicas, puedan estar también involucrados en la evolución de la cardiopatía chagásica crónica. El objetivo de este estudio es determinar la importancia del mecanismo de multiplicación de células musculares cardíacas en el desarrollo de la lesiones chagásicas. Para ello hemos investigado la presencia de una proteína indispensable para la progresión del ciclo celular denominada antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), en el corazón de ratas infectadas experimentalmente con *T. cruzi*. Se utilizaron ratas Wistar de 4-6 semanas de edad, las cuales fueron inoculadas intraperitonealmente con 10^6 tripomastigotes del clon de *T. cruzi* Sylvio-X10/4 obtenidos de cultivos celulares. Los animales fueron anestesiados con éter y sacrificados por dislocación cervical a los 30 (8 infectados y 4 controles), 370 (8 infectados y 7 controles) y 515 (4 infectados y 4 controles) días post-infección (dpi) respectivamente. Se tomaron muestras de diferentes áreas del corazón, las cuales fueron fijadas inmediatamente en formol buffer al 10%, procesadas rutinariamente y embebidas en Paraplast. Se realizaron cortes seriados de 3-5 μm de espesor, sobre los cuales se realizó la técnica de inmunoperoxidasa, utilizando un anticuerpo monoclonal anti-PCNA humano (PharMingen Laboratorios, San Diego, California). Los cortes histológicos se evaluaron al microscopio óptico utilizando una grilla que comprende una superficie de $0,062 \mu\text{m}^2$ a un aumento de 400X. En cada corazón se estudiaron 8 campos/pared ventricular, comprendiendo una superficie total de $1,488 \text{ mm}^2/\text{corazón}$, incluyéndose igual número de áreas con y

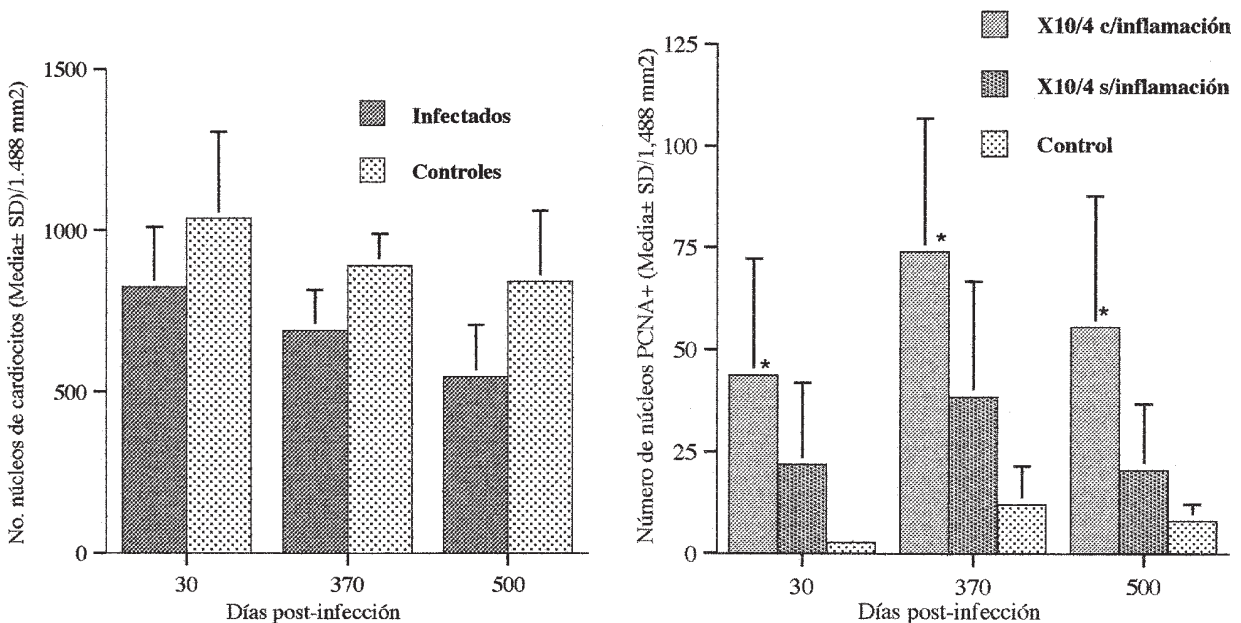


Fig. 1.- A. Cuantificación de núcleos de células musculares cardíacas en ratas infectadas con *T. cruzi* y controles. B. Cuantificación de núcleos de células musculares cardíacas marcadas positivamente para PCNA en ratas infectadas con *T. cruzi* y controles. * indica diferencias estadísticamente significativa

sin inflamación en los animales infectados. En todos los campos se cuantificaron independientemente el número total de núcleos de miocitos cardíacos y el número de núcleos marcados positivamente con el anticuerpo anti-PCNA. Los resultados de esta evaluación demostraron que el número total de núcleos de miocitos cardíacos en los animales infectados es inferior al de los respectivos controles, en las diferentes etapas de la infección estudiadas (Fig. 1A). La disminución del número de núcleos de miocitos cardíacos en los animales infectados podría ser atribuido a la desaparición de fibras miocárdicas, la presencia de edema e infiltración intersticial de células inflamatorias y fibrosis, así como también a un posible aumento del tamaño de las fibras miocárdicas (hipertrofia). El número total de núcleos de miocitos cardíacos PCNA+ fué significativamente mayor en los animales infectados a los 30 y 370 dpi respecto de los controles

($p < 0,05$; datos no mostrados). Sin embargo, el análisis discriminado de las áreas inflamadas respecto de las no inflamadas de los animales infectados, y los controles separadamente, demostró diferencias entre las áreas inflamadas respecto de los controles solamente (Figs. 1B y 2). No se encontraron diferencias significativas entre el número de núcleos PCNA+ de las áreas no inflamadas de los animales infectados, y los controles. Estos datos demuestran claramente la participación del mecanismo de hiperplasia celular miocárdica en la remodelación cardíaca, durante la miocarditis chagásica experimental. La estrecha relación de la hiperplasia con el proceso inflamatorio local indica una participación de este último en el desarrollo de la patología chagásica.

Otro objetivo de nuestro trabajo es determinar el rol de la fibra miocárdica en el control del parasitismo intracelular. Recientemente se ha demostrado que las

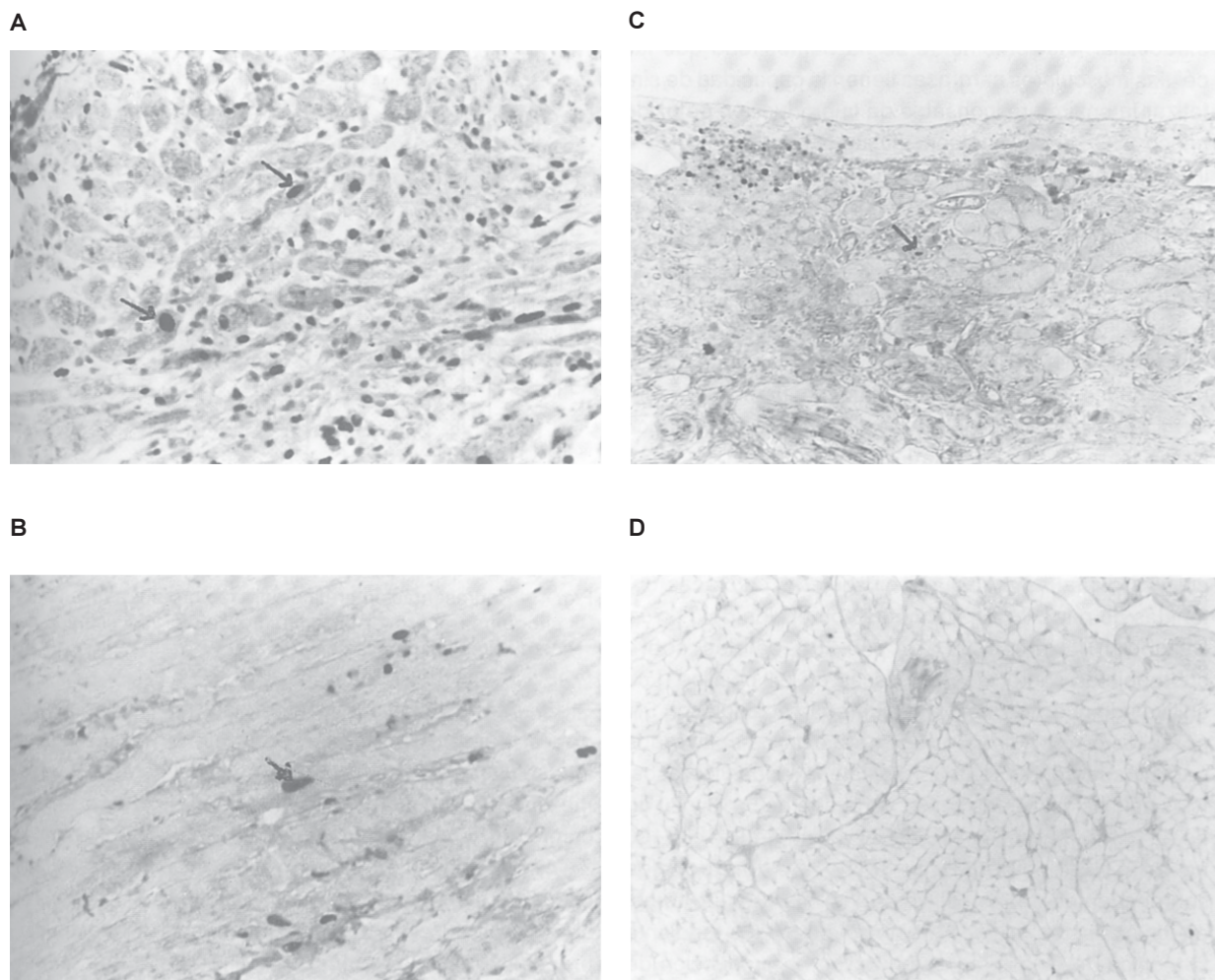


Fig. 2.- Las microfotografías muestran la detección de PCNA en fibras miocárdicas por inmunoperoxidasa en el miocardio de ratas Wistar infectadas con *T. cruzi*. A: 30 dpi. Notar la presencia de varios núcleos de fibras miocárdicas PCNA+ e infiltrados inflamatorios (100X). B: 370 dpi. Núcleo PCNA+ en fibra miocárdica e infiltrados inflamatorios intersticiales leves (200X), C: 515 dpi. Nótese la disminución de la densidad de fibras miocárdicas, la presencia de núcleos PCNA+ e inflamación y fibrosis intersticial, 50X D: Control no infectado, 25X.

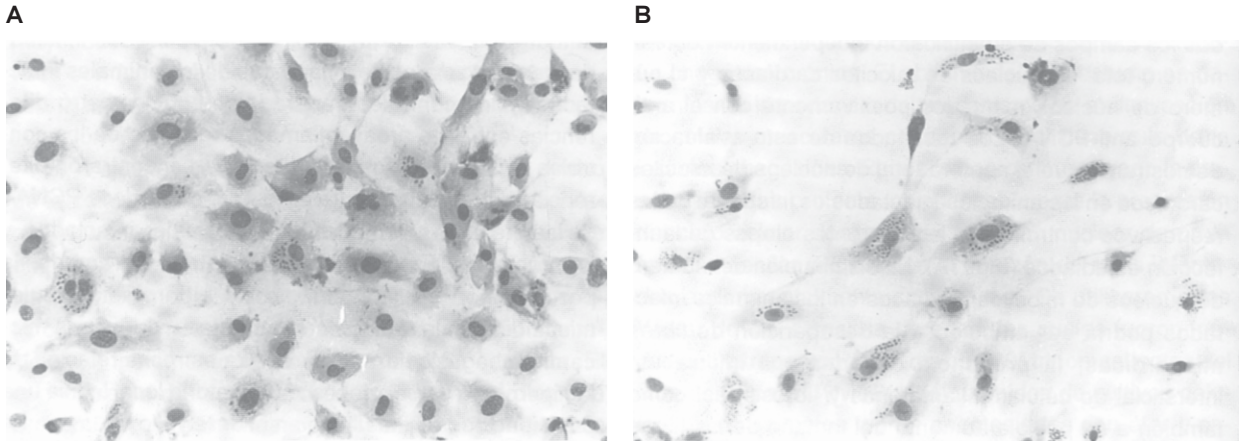


Fig. 3.- Microfotografías de cultivos de cardiocitos infectados con *T. cruzi*, 72 horas post-infección. A. Cultivo de cardiocitos tratados con IFN- γ + IL-1 β + TNF- α y B. Cultivo de cardiocitos sin estimulación (control). Nótese el menor número de células infectadas en el cultivo tratado con citoquinas

células musculares cardíacas tienen la capacidad de sintetizar la enzima responsable de la producción de óxido nítrico (NOS) en forma constitutiva e inducible (cNOS e iNOS respectivamente). La presencia de iNOS se ha descrito en cardiocitos de ratas y ratones infectados con *T. cruzi*, sugiriendo que el óxido nítrico (NO) podría tener un rol importante en la patogénesis de la cardiomiopatía chagásica^{21, 22}. Por otro lado, varios autores demostraron que la capacidad tripanocida de los macrófagos activados por citoquinas es mediada por el óxido nítrico^{23, 24}. El presente estudio está dirigido a determinar si la capacidad de los cardiocitos de producir NO in vitro se altera por la infección con *T. cruzi*, y su acción sobre el parasitismo intracelular bajo la influencia de tres diferentes citoquinas, previamente estudiadas en la miocarditis chagásica^{25, 26}. Para ello se han infectado cultivos primarios de células musculares cardíacas obtenidas de ratas Wistar neonatas con el clon de *T. cruzi* Sylvio-X10/4. Se colocaron 50.000 células sobre cubreobjetos contenidos en placas de 24 pocillos. Los cultivos de miocitos cardíacos fueron infectados con 5:1 parásitos/célula y luego de 4 horas de co-cultivo, los parásitos fueron extraídos mediante lavados vigorosos, y las células cultivadas con el agregado de 5, 10 y 20 ng de IL-1 β /ml, 5 ng de IL-1 β + LPS y 5 ng de IL-1 β + 100 ng de TNF- α + 500 U de IFN- γ . Se tomaron los sobrenadantes de los cultivos a las 24, 48 y 72 horas, en los cuales se midió la presencia de nitritos mediante la técnica de Griess, como un índice de producción de NO. Luego de las 72 horas de cultivo, las células fueron fijadas en metanol y coloreadas con Giemsa. El parasitismo celular se evaluó al microscopio óptico, cuantificándose el número de células parasitadas en muestras triplicadas, en un total de 600 células por tratamiento.

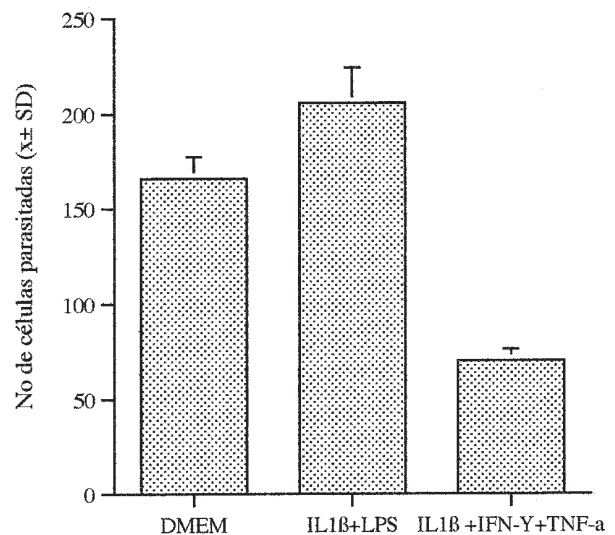


Fig. 4.- Representación gráfica del efecto del tratamiento de citoquinas sobre el parasitismo celular de cultivos de cardiocitos infectados con *T. cruzi*

El análisis de los datos del parasitismo celular mostró que el número de células conteniendo amastigotes intracelulares es menor en los cultivos tratados con la mezcla de citoquinas IL-1 β , IFN- γ y TNF- α que en los controles y en las células tratadas con IL-1 β +LPS (Figs. 3 y 4)). No hubo diferencias en el parasitismo intracelular de los tratados con IL-1 β +LPS y los controles. El análisis de la producción del óxido nítrico mostró un aumento progresivo de la concentración de nitritos en el sobrenadante de los cultivos estimulados con citoquinas, tanto de miocitos infectados como en los controles no infectados (Figs. 5 y 6). La producción de óxido nítrico en los cultivos de cardiocitos no estimulados (infectados

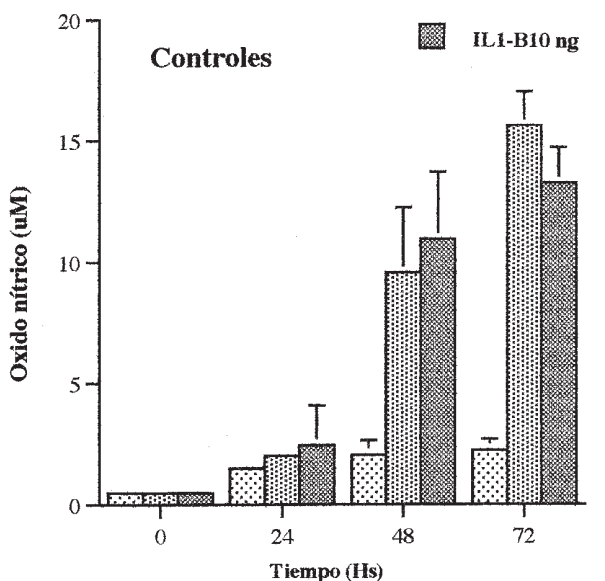
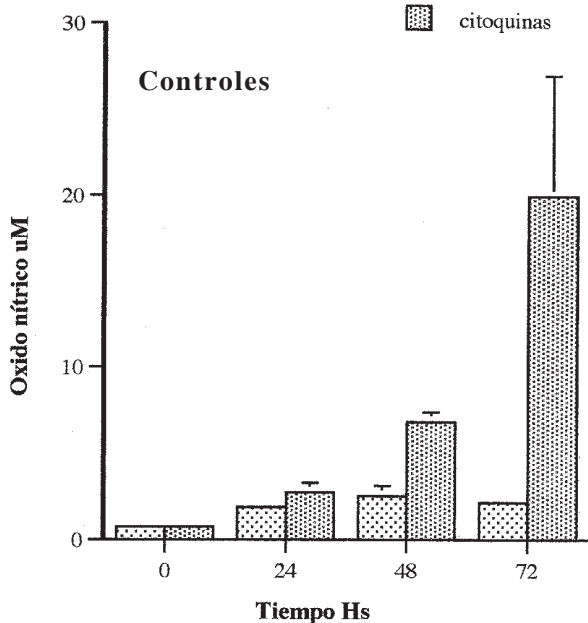
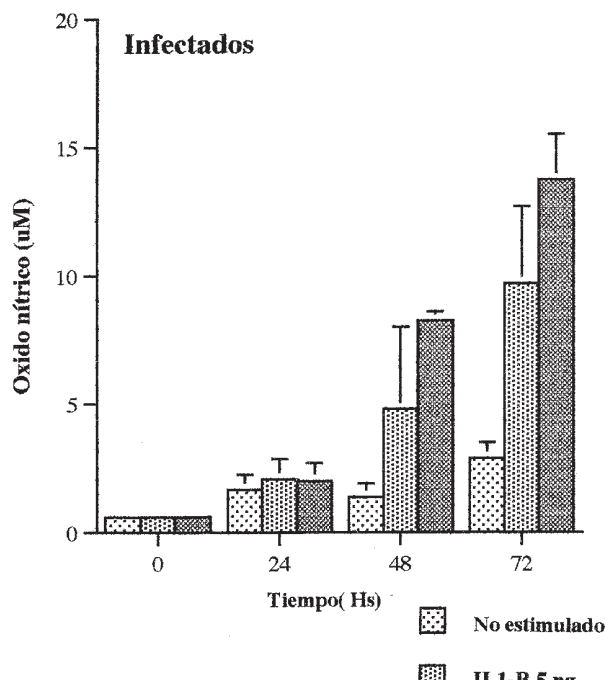
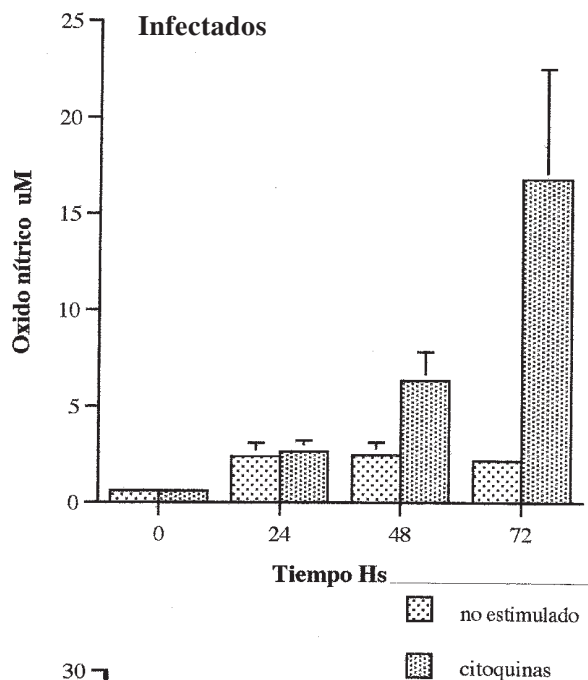


Fig. 5.- Representación gráfica de la concentración de óxido nítrico en el sobrenadante de cultivos de cardiocitos estimulados con IFN- γ , IL-1 β y TNF- α .

Fig. 6.- Representación gráfica de la concentración de óxido nítrico en el sobrenadante de cultivos de cardiocitos estimulados con diferentes concentraciones de IL-1 β beta.

y no infectados) se mantuvo en el nivel basal, no modificándose por la infección. En general, el incremento de los nitritos fué ligeramente menor en los cultivos infectados en relación a los no infectados. El análisis de la curva dosis-respuesta de la citoquina IL-1 β mostró que no existen diferencias significativas en la producción de nitritos entre las 3 dosis de la citoquina estudiadas. Por otro lado, el agregado de L-NAME al medio, inhibe la producción de óxido nítrico por estos cultivos. Estos datos

demuestran que las células musculares cardíacas tienen la capacidad de controlar la multiplicación intracelular del *T. cruzi* ante el estímulo de determinadas citoquinas, y que la capacidad de producción de óxido nítrico se afecta solo parcialmente por la infección.

Los resultados obtenidos de estos estudios demuestran que el compartimiento celular miocárdico no permanece pasivo, sino que participa activamente en la respuesta del organismo a la infección experimental con *T.*

cruzi, utilizando diferentes mecanismos biológicos, en asociación a la respuesta inmune. Esta participación podría tener un rol fundamental en el desarrollo y la evolución de la enfermedad de Chagas experimental.

Agradecimientos: Los autores expresan su agradecimiento a la Dra. Elsa Leonor Segura, ANLIS, por su aporte científico, y a Licenciada Raquel Quatrini por la ayuda técnica.

Bibliografía

- Laranja FS, Dias E, Dobreaga G, Miranda A. Chagas' diseases. A clinical, epidemiologic and pathologic study. *Circulation* 1956; 14: 1035-60.
- Rosenbaum MB. Chagasic myocardiopathy. *Progress in Cardiovascular Diseases* 1964; 7: 199-225.
- Andrade ZA, Andrade S. Patología. En: Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas, Ed. Zigman Brener y Zilton Andrade, Capítulo 6. Editorial Guanabara Koogan SA, Rio de Janeiro 1979.
- d'Avila Reis D, Jones EM, Tostes S, Lopes ER, Gazzinelli G, Colley DG, and McCurley TL. Characterization of inflammatory infiltrates in a chronic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor-alpha + cells and dominance of granzyme A+, CD8+ lymphocytes. *Am J Trop Med Hyg* 1993; 48: 637-44.
- Carrasco Guerra HA, Palacios-Pru E, Dagert de Scorza C, Molina C, Inglessis G, Mendoza RV. Clinical, histo-chemical and ultrastructural correlation in septal endo-myocardial biopsies from chronic chagasic patients. Detection of early myocardial damage. *Am Heart J* 1987; 113: 716-24.
- Andrade ZA. Mechanisms of myocardial damage in T. cruzi infection. *Ciba Found Symp* 1983; 99: 214-33.
- Brener Z, Gazzinelli RT. Immunological control of Trypanosoma cruzi infection and pathogenesis of Chagas' disease. *Int Arch Allergy Immunol* 1998; 114: 103-10.
- Hudson L, Britten V. Autoimmune phenomena in chronic chagasic cardiopathy. *Parasitol Today* 1985; 1: 6-9.
- Kierszenbaum F. Is there autoimmunity in Chagas' disease? *Parasitol Today* 1985; 1: 4-6.
- Petry K y Eisen H. Chagas' disease: a model for the study of autoimmune disease. *Parasitol Today* 1989; 5: 111.
- Olivares-Villagomez D, McCurley TL, Vnencak-Jones CL, Correa-Oliveira R, Colley DG, Carter CE. Polymerase chain reaction amplification of three different T. cruzi DNA sequences from human chagasic cardiac tissue. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 59: 563-70.
- Oliveira Almeida H de, Antunes Teixeira VP, Gobbi H, Rocha A, Costa Brandao M de. Inflamacao associada a células musculares cardíacas parasitadas pelo T. cruzi, em chagásicos crônicos. *Arq Bras Cardiol* 1984; 42/3: 183-6.
- Postan M, Dvorak JA & McDaniel JP. A comparison of the course of infection of C3H/HeN mice with two clones isolated from a common source. *Am J Trop Med Hyg* 1983; 32: 497-506.
- Postan M, Bailey JJ, Dvorak JA, McDaniel JP, Pottala EW. Studies of T. cruzi clones in inbred mice. III. Histopathological and electrocardiographical responses to chronic infection. *Am J Trop Med Hyg* 1987; 37: 541-9.
- Higuchi MD, Reis MM, Aiello VD, Benvenuti LA, Gutierrez PS, Bellotti G, Pileggi R. Association of an increase in CD8+ T cells with the presence of Trypanosoma cruzi antigens in chronic, human Chagasic myocarditis. *Am J Trop Med Hyg* 1997; 56: 485-9.
- Tarleton RL, Koller BH, Latour A, Postan M. Susceptibility of Beta-2 microglobulin-deficient mice to T. cruzi Infection. *Nature* 1992; 356: 338-40.
- Tarleton RL, Grusby MJ, Postan M, Glimcher LH. T. cruzi infection in MHC-deficient mice: further evidence for the role of both class-I and class II-restricted T cells in immune resistance and disease. *Internat Immunol* 1995; 8: 13-22.
- Kajstura J, Leri A, Finato N, Di Loreto C, Beltrami CA, Anversa P. Myocyte proliferation in end-stage cardiac failure in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 5: 8801-5.
- Liu Y, Cigola E, Cheng W, Kajstura J, Olivetti G, Hintze Anversa P. Myocyte nuclear mitotic division and programmed myocyte cell death characterize the cardiac myopathy induced by rapid ventricular pacing in dogs. *Lab Invest* 1995; 6: 771-87.
- Quaini F, Cigola E, Lagrasta C, Saccani G, Quaini E, Rossi C, Olivetti G, Anversa P. End-stage cardiac failure in humans is coupled with the induction of proliferating cell nuclear antigen and nuclear mitotic division in ventricular myocytes. *Circ Res* 1994; 75: 1050-63.
- Chandrasekar B, Melby PC, Troyer DA, Colston JT, Freeman GL. Temporal expression of pro-inflammatory cytokines and inducible nitric oxide synthase in experimental acute chagasic cardiomyopathy. *Am J Pathol* 1998; 152: 925-34.
- Huang H, Chan J, Wittner M, Weiss LM, Bacchi CJ, Yarett N, Martinez M, Morris SA, Braunstein V, Factor SM, Tanowitz HB. Trypanosoma cruzi infection induces myocardial nitric oxide synthase. *Cardiovasc Pathol* 1997; 6: 161-6.
- Muñoz-Fernandez MA, Fernandez MA, Fresno M. Activation of human macrophages for the killing of intracellular T. cruzi by TNF-alpha and IFN-gamma through a nitric oxide-dependent mechanisms. *Immunol Letters* 1992; 33: 35-40.
- Metz G, Carlier Y, Vray B. Trypanosoma cruzi upregulates nitric oxide release by IFN-gamma preactivated macrophages, limiting cell infection independently of the respiratory burst. *Parasite Immunol* 1993; 15: 693-9.
- Zhang L, Tarleton RL. Characterization of cytokine production in murine T. cruzi infection by in situ immunocytochemistry: lack of association between susceptibility and type 2 cytokine production. *Eur J Immunol* 1996; 1: 102-9.
- Cunha-Neto E, Rizzo LV, Albuquerque F, Guilherme L, Bocchi E, Bacal F, Carrara D, Ianni B, Mady CD, Khalil J. Cytokine production profile of heart-infiltrating T cells in Chagas' disease Cardiomyopathy. *Braz J Med Biol Res* 1998; 31: 133-7.