

CARDIOPATÍA CHAGASICA: IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE CÉLULAS INFILTRANTES, EN CORAZONES DE PACIENTES QUE SUFRIERON MUERTE CARDIACA A DISTINTAS EDADES.



Humberto R. A. Cabral, Ivón T. C. Novak, T. Mónica Glocker, Guido A. Castro Viera.
Instituto de Biología Celular, Facultad de Ciencias Médicas,
Universidad Nacional de Córdoba.

Resumen

Esta investigación fue realizada para obtener datos nuevos sobre factores que intervinieran en la producción y progresión de la cardiopatía chagásica humana (CChH) con muerte por fallo cardíaco. Estudiamos muestras cardíacas de pacientes que murieron a edad temprana, y más tardía. METODOS: Caracterizamos y cuantificamos los tipos de células infiltrantes mediante anticuerpos monoclonales; y con métodos histológicos clásicos. RESULTADOS: Hallamos intensa infiltración intracardíaca por linfocitos que reaccionaron con el anticuerpo para CD45RO que muestra linfocitos T activados (más de 70%). Similar número mostró reactividad para subtipo CD4. Dichos linfocitos mostraron sustancias PAS+ en citoplasma. Macrófagos fueron detectados en número superior a 25%. Pocos linfocitos reaccionaron para CD8. Hubo un número muy bajo de linfocitos B. Otras células infiltradas fueron mastocitos intramiocárdicos, en número elevado. Cualitativamente, esos hallazgos fueron similares en los dos grupos de pacientes. Cuantitativamente, el número de linfocitos T y el de mastocitos fue significativamente mayor en los casos que sufrieron muerte temprana ($p < 0.001$). No se observó *T.cruzi*. Se observaron daños en cardiomiocitos, con linfocitos T y macrófagos adheridos. CONCLUSIONES: Los hallazgos sugieren una activa e intensa existencia de mecanismos inmunocelulares en la producción y evolución de la CChH grave, en los que intervienen linfocitos T CD4+, con sustancias PAS+, macrófagos, y mastocitos. Dichas células, mostraron citoadherencia a cardiomiocitos con

lesiones; y por su ubicación y número asociáronse también a arritmias cardíacas malignas. En base a dichos hechos sugerimos que serían causas de pobre performance cardíaca en la CChH, y merecerían considerarse con respecto a estrategias terapéuticas.

Palabras Clave: Cardiopatía chagásica-células infiltrantes intracardíacas - autoinmunidad- linfocitos T-linfocitos T PAS positivos-macrófagos-mastocitos-factores inmunocelulares de daños a cardiomiocitos-pobre performance cardíaca-arritmias cardíacas malignas

Abstract

The purpose of this work was to obtain new data on factors intervening in the production and progression of human chagasic cardiopathy (HChC) with death by cardiac failure. We studied cardiac samples of patients that died at an early mean age versus others that died at older ages.

The infiltrating cells were characterized and quantified by means of specific monoclonal antibodies and immunohistochemical methodology; and by classical histological and histochemical methods.

We found intense cardiac infiltration by lymphocytes that reacted with the antibodies anti-CD45RO against activated T-lymphocytes (<70%). A similar number showed reactivity for CD4. And, in serial sections, showed PAS+ substances in their cytoplasm. Macrophages were detected in a number of 25%. Few lymphocytes reacted to CD8. There was a low number of B lymphocytes. Other noticeable infiltrated cell were intramiocardial

mast cells. Qualitatively, such findings were similar in the two groups of patients. However, the number of T-lymphocytes and of the mast cells was significantly higher in the cases that underwent early cardiac death ($p < 0.001$). *T. cruzi* was not found. In cardiomyocytes, damages were found, with T-lymphocytes and macrophages adhered to their sarcolemma, as well as mast cells.

CONCLUSIONS These findings suggest the existence of an active and intense occurrence of immunocellular mechanisms in the production and evolution of severe HChC, in which T-lymphocytes CD4+ intervene, with production and secretion of PAS+ substances; Besides, macrophages, and mast cells, in that order. The quantity of infiltrated cells was positively associated with the occurrence of malignant arrhythmias. We suggest that such facts would be involved in the poor cardiac performance of the chagasic heart disease that leads to cardiac death. Indeed, they seem be worthy of consideration with respect to therapeutic strategies.

Key words: Chagasic cardiopathy-intracardiac infiltrating cells- autoimmunity-T lymphocytes- PAS+ T lymphocytes-macrophages-mast cells-immunocellular factors of cardiomyocytes damage- Poor cardiac performance-cardiac arrhythmias.

Introducción

La cardiopatía chagásica crónica, lleva muchas veces a la invalidez, y a la muerte súbita o por insuficiencia cardíaca irreversible. En la Argentina hay más de dos millones de infectados por *Trypanosoma cruzi*, de los cuales más de 500 mil son portadores de miocardiopatía chagásica.

El corazón chagásico sufre lesiones de sus cardiomiocitos, remodelación patológica, fibrosis, y otras lesiones, como las de estructuras neurales. El debut clínico de la cardiopatía chagásica se produce, generalmente, en la tercera década de la vida, con progresión hacia insuficiencia durante la quinta y sexta década de vida; pero puede observarse que hay casos graves cuyas manifestaciones son más intensas y llegan a una etapa final más precozmente,

con más alteraciones de la contractilidad, del ritmo cardíaco y de la conductibilidad. El presente estudio fue realizado para obtener datos nuevos sobre factores celulares que intervenirían en la producción y progresión de la cardiomiopatía chagásica humana con muerte por fallo cardíaco. Hay un marco teórico y experimental que indica la existencia de mecanismos inmunopatológicos en la producción de la cardiomiopatía crónica (1, 4, 5, 7, 10). En el presente trabajo, hemos realizado un estudio comparativo de los tipos de células inmunológicas infiltradas en el corazón en casos de cardiopatas chagásicos que distribuimos en dos grupos, unos de muerte en edad relativamente temprana, y otros que murieron luego de años de deterioro cardíaco.

Material y Métodos

Se obtuvieron muestras cardíacas de 16 pacientes fallecidos por enfermedad cardíaca chagásica. El diagnóstico fue establecido por reiteradas reacciones específicas para Chagas, y los antecedentes epidemiológicos. En un caso obtuvimos material fresco por cirugía.

Los datos de estudio macroscópico de autopsias fueron comparados, así como datos clínicos.

Se realizaron métodos histológicos, citoquímicos e inmunotinciones, El material fue fijado, generalmente, en formalina. Utilizamos para comparación cortes seriados de cada caso y área cardíaca. Empleamos los siguientes anticuerpos monoclonales: CD45 RO (clon UCHL-1), CD4, CD8; L26 para CD20, MB2, LN2 para CD74; LN5 y para CD68, y métodos de Biotina-Streptavidina/Fosfatasa Alcalina/Fast Red (Biogenex).

Además, técnicas clásicas: Hematoxilina-eosina; Azul de Toluidina pH 1; Reacción de ácido periódico y reactivo de Schiff (PAS); Feulgen; PAS-con digestión previa con amilasa.

Las preparaciones se examinaron a 400 x (tres observadores); se contaron 500 células infiltradas, en cada caso, en áreas de infiltración difusa, y el número porcentual de cada tipo celular fue determinado. Por otra parte, se investigó la presencia de acúmulos

celulares infiltrados a 100 x, aspectos que fueron estimados de 0 a +++++. En zonas de infiltrados difusos se cuantificaron las células infiltrantes totales a 400 x. Las áreas de fibrosis se evaluaron desde 0 a +++++. Las células cebadas (mastocitos) se estudiaron exclusivamente en miocardio, en 30 campos a 400 x, y se registraron solamente las que estaban en contacto con cardiomiocitos.

Resultados

En las Tabla 1 se muestran los resultados del examen macroscópico de los corazones estudiados. En las Tablas 2 y 3 se consignan los resultados de los estudios microscópicos con anticuerpos marcadores moleculares para células infiltrantes, y de las técnicas clásicas para las mismas.

TABLA 1. CARDIOPATIA CHAGASICA. CON MUERTE POR FALLO CARDIACO. ESTUDIO EN PACIENTES QUE FALLECIERON HOSPITALIZADOS

GRUPO Y CAUSA DE MUERTE	Edad media al morir	Peso cardíaco (autopsia)	Aumento del tamaño cardíaco	Aneurismas cardíacos	Trombos intracardíacos	Marcapasos colocado
I (n = 7) Cardíaca temprana	43.1	415 gramos (330 - 583 g)	(++)	(+)	(+)	En 5 casos
II (n= 9) Cardíaca No temprana	62.5	618 gramos (500 - 910 g)	(++++)	(++)	(+++)	En 2 casos

TABLA 2. CARDIOPATIA CHAGASICA. CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS EN PACIENTES QUE FALLECIERON POR FALLO CARDIACO, HOSPITALIZADOS.

GRUPO	Miocitosis activas	Fibrosis	Cuantificación de células totales linfo-monocitarias intracardíacas	Acúmulos linfomonocitarios intracardíacos
I (n = 7) muerte temprana	(+++)	(+)	46±6.8 células por campo a 400 x	(++++)
II (n= 9)	(++)	(++++)	15±3.6 células por campo a 400 x	(+)

Cabral, Novak, Glocker y Castro Viera

TABLA 3. CARDIOPATIA CHAGASICA. CARACTERÍSTICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS EN PACIENTES QUE FALLECIERON POR FALLO CARDIACO, HOSPITALIZADOS.

GRUPO	Linfocitos T CD45 RO +	Linfocitos T CD4 +	Linfocitos T CD8 +	Linfocitos PAS+ intracardíacos	Macrófagos LN5 + y para CD68 +	Linfocitos B L26 + para CD20 +
I (n = 7) muerte temprana	≥ 70 %	≥ 65%	< 5 %	≥65 %	≥ 27%	≤ 1,5 %
II (n= 9)	≥68 %	≥65 %	< 5 %	≥ 55 %	≥ 25 %	≤ 1.5 %

Cabral, Novak, Glocker y Castro Viera

TABLA 4. MASTOCITOS EN MIOCARDIO CONTRACTIL DE CORAZONES DE PACIENTES CHAGÁSICOS FALLECIDOS POR MUERTE CARDIACA (los datos se refieren exclusivamente a esa localización)

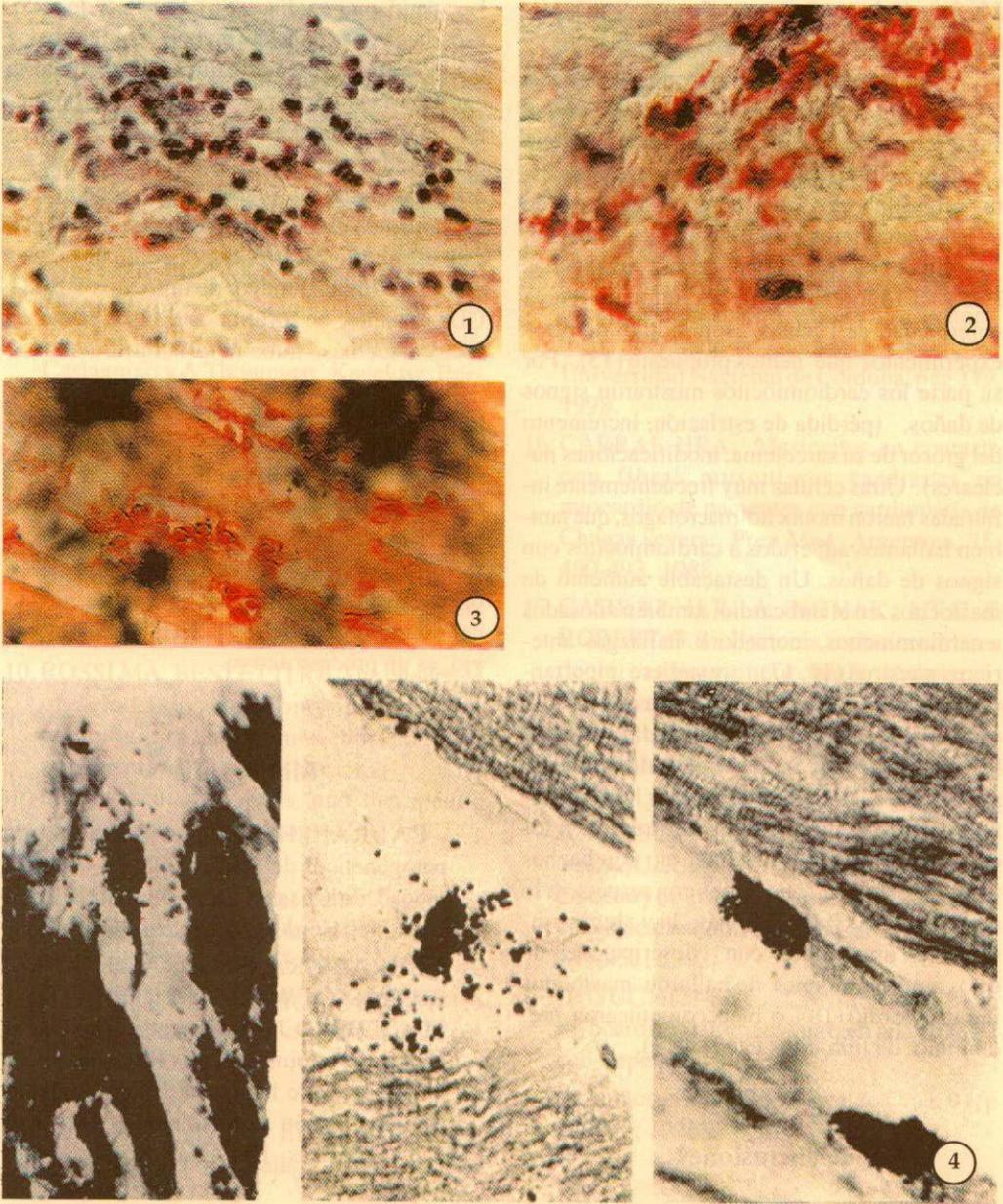
Grupo I: (muerte temprana)	1.60± 0.28 por campo a 400x
Grupo II: (no temprana)	0.79± 0.25 por campo a 400x

* En corazones normales los mastocitos se hallan en: localizaciones perivasculares; en el endocardio, dentro de tejido adiposo; y otras; y su número total comunicado fue: 0.2 por campo a 400 x (Fernex, 1968) (11); 0.12 por campo a 400x (Helstrom & Holmgren, 1950) (12); 0.5 por campo a 400 x (Turlington & Edwards, 1988) (13).

Además de lo descrito en las Tablas, debe destacarse que se observó adherencia de linfocitos T, de linfocitos T PAS positivos, y de macrófagos, respectivamente, a fibras musculares cardíacas las cuales mostraron signos de estar sufriendo daños. Con la coloración del PAS, en casos de cardiomiocitos con linfocitos adheridos, se observó imágenes que sugerían que sus gránulos PAS+ se orientan y son secretados hacia el cardiomiocito. Con respecto a las células cebadas (mastocitos), se halló un número alto en contacto con cardiomiocitos, y mayor en los casos de evolución a muerte más temprana.

Discusión

Los hallazgos descriptos en Resultados, y su cuantificación, sugieren que en estas etapas avanzadas de la cardiopatía chagásica crónica tendrían importancia, principalmente, los aspectos celulares. La producción de anticuerpos sería poco intensa, a juzgar por el número bajo de células B intracardíacas. El predominio de linfocitos T, con receptor CD4, en infiltraciones difusas y en focos, tuvo especial incidencia en los casos de muerte más temprana; en las áreas difusas, hubo en promedio, 46±6.8 células infiltradas por campo, versus



Figuras 1 y 2: Miocardios de corazón de pacientes con CChC con muerte temprana.

Inmunomarcación positiva, con anticuerpos monoclonales para linfocitos T activados. El mayor número de los linfocitos infiltrados muestran coloración positiva, roja (CD45RO, usando el cromógeno Fast Red). Coloración nuclear de contraste con hematoxilina, 400 x. En la Figura 2, obsérvese la adhesión de linfocitos CD45RO+ a miocitos cardíacos en destrucción. Cabral, Novak, Glocker, Castro Viera

Figura 3: Miocardio de paciente chagásico fallecido por CChC grave. Inmunotinción positiva

para monocito-macrófagos. Parte de las células infiltrantes reaccionaron positivamente. Anticuerpo monoclonal LN2 para CD74; se usó técnica de "antigen retrieval" y el cromógeno Fast Red. Coloración nuclear de contraste con Hematoxilina, 400x.

Figura 4: Mastocitos en miocardios de pacientes con CChC fallecidos por muerte cardíaca.

Obsérvese los mastocitos adheridos a cardiomiocitos, en a, b, y c. Azul de Toluidina, 400x. Cabral, Novak, Glocker, Castro Viera

15±3.6 células en los casos de muerte más tardía ($p < 0.001$).

Los linfocitos mostraron substancias PAS+ en el citoplasma, y otros aspectos que sugieren secreción de sus productos hacia cardiomiocitos, a los que muchos de ellos estuvieron adheridos, corroborando hallazgos de trabajos anteriores nuestros (1, 2, 3, 8, 14, 16, 17). La caracterización de las substancias PAS+ T linfocitarias de los linfocitos en la enfermedad de Chagas, son motivo de otros experimentos que hemos propuesto (15). Por su parte los cardiomiocitos mostraron signos de daños. (pérdida de estriación, incremento del grosor de su sarcolema, modificaciones nucleares). Otras células muy frecuentemente infiltradas fueron monocito-macrófagos, que también hallamos adheridos a cardiomiocitos con signos de daños. Un destacable aumento de mastocitos en el miocardio, también adosados a cardiomiocitos, corrobora hallazgos anteriores nuestros (16, 17) y sugiere importancia de esas células en los procesos de cardiopatía chagásica. Estos hallazgos, que han mostrado mayor cuantía estadísticamente significativa ($p < 0.001$) de todas las mencionadas células intracardíacas infiltrantes en los casos de evolución mas intensa, son hechos nuevos en lo que conocemos con respecto a lo descripto en CChH. Además, hay algunas diferencias importantes con descripciones de otros autores, quienes no hallaron mastocitos intramiocardio (18), o bien, comunicaron predominio de linfocitos CD8+ (19).

Conclusiones

Nuestros hallazgos se inscriben en el marco teórico y experimental que sugiere y postula la participación importante de mecanismos inmunológicos en la producción de la cardiopatía chagásica, con manifestaciones de tipo autoinmune- símiles (1, 9, 10).

Por otra parte, partiendo del enfoque comparativo con que abordamos este trabajo, también han surgido otros datos nuevos sobre el estado macro y microscópico, de los corazones de casos de muerte más temprana y tardía, respectivamente; en efecto, clásicamente se menciona como una de las lesiones significativas del corazón chagásico a la fibrosis y

los aneurismas cardíacos (6). Sin dejar de serlo, esos hechos fueron de menor cuantía en los pacientes de este estudio que sufrieron muerte cardíaca más temprana, los que tuvieron menor dilatación e hipertrofia cardíaca, pese a su deteriorada performance. Y, destacamos, que las arritmias malignas fueron más frecuentes en esos mismos casos de muerte temprana. Según este estudio lo mostró, hubo en dichos casos un número mucho mayor de linfocitos T PAS+ CD4+, tanto en infiltrados difusos como en focos. Además, hubo notoria infiltración de monocitos-macrófagos, y de mastocitos en miocardio, epicardio y endocardio de los casos de muerte temprana. Dichos hechos sugieren importancia de las actividades de dichas células en la producción y progresión de la CChH grave; y pueden contribuir a explicar recidivas post intervenciones terapéuticas, o bien a escoger otros métodos para el tratamiento del estadio grave de la CCHH, que, como se vió, es un proceso activo.

Bibliografía

1. CABRAL HRA: Los mecanismos patogénicos del daño tisular en la enfermedad de Chagas. Rev Fac Cienc Med Univ Nac Cordoba, 24, 419-431, 1969
2. CABRAL HRA, SEGURA- SECO EL, PAOLASSO EW, CASTOLDI F, VELOSO M, CICHERO J. Enfermedad de Chagas aguda y Autoinmunidad (Hipótesis sobre la patogenia de la injuria tisular e intento de verificación experimental) Rev Fac Cienc Médicas Univ Nat Córdoba, 25: 419-431, 1967.
3. CABRAL HRA. PAS-positive substance in lymphocytes of patients with Chagas disease. Lancet 1: 1356-1357, 1971.
4. JORG ME: Tentativas experimentales de producción de cardiopatía crónica con Trypanosoma cruzi y condicionamiento bioquímico. Contribución al estudio de la patogenia de la enfermedad de Chagas crónica. Pren Méd Argentina, 23 1435-1441, 1965
5. SANTOS-BUCH, ChA, TEIXEIRA ARL: The immunology of experimental Chagas' disease. III. Rejection of allogeneic

- heart cells in vitro. *J Exp Med*, 140, 38-1974.
6. JORG ME Patogenia de los aneurismas ventriculares chagásicos. Teoría inmunológica. *En* *Cardiopatía Chagásica* por H. E. Castagnino y A Thompson, Kapelusz, Buenos Aires, 1980, págs 132-133.
 7. JORG ME Respuestas inmunogénicas en la infección por *Trypanosoma cruzi*, *En* *Cardiopatía Chagásica* por H. E. Castagnino y A Thompson, Kapelusz, Buenos Aires, 1980, págs 211-222
 8. CABRAL HRA. The tumoricidal effect of *Trypanosoma cruzi*: its intracellular cycle and the immune response of the host. *Medical Hypotheses*, 54 (1) 1-6, 20007.
 9. ANDRADE Z. Immunopathology of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94: Suppl 1: 71-80, 1999.
 10. ROSSI MA, BESTETTI RB. The challenge of chagasic cardiomyopathy. The pathologic of autonomic abnormalities, autoimmune mechanisms and microvascular changes, and therapeutic implications. *Cardiology* 1995; 86:1-7, 1995
 11. FERNEX M: The mast-cells system: its relationship to atherosclerosis, fibrosis and eosinophils. Karger AG, Basel, 1968
 12. HELLSTROM B, HOLMGREM HJ Numerical distribution of mast cells in the human skin and heart. *Acta Anat (Basel)* 10: 81-107, 1950.
 13. TURLINGTON BS, EDWARDS; WD. Quantitation of mast cells in 100 normal and 92 diseased human hearts. Implications for interpretation of endomyocardial biopsy specimens. *Am J Cardiovasc Pathol*, 2: 151-157, 1988
 14. CABRAL HR, BRAXS J: Producción de una glicoproteína por linfocitos T en la cardiopatía chagásica. *Medicina (Bs As)*, 42, 415-421, 1982.
 15. CABRAL HRA *En* Directorio de Proyectos de Investigación y Desarrollo Tecnológico, Secretaría de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Córdoba, pág 179, 1998.
 16. CABRAL HRA. Mastocitos en contacto con fibras musculares cardíacas en miocardio de pacientes con cardiopatía de Chagas severa. *Pren Med Argentina*, 75: 490-493, 1988
 17. CABRAL H.R. A, NOVAK, I.T.C & ROBERT G.B., Factores inmunocelulares de la cardiomiopatía chagásica: Linfocitos T Pas +. Incremento de mastocitos. *Vénulas de Endotelio Alto*. *Pren Méd Argentina*, 85: 525-532, 1998.
 18. MILEI J, STORINO R, FERNANDEZ ALONSO G, BEILGEMAN R, VANZULLI S, FERRANS V, Endomyocardial biopsies in chronic chagasic cardiomyopathy. *Cardiology*, 80: 424-431, 1992.
 19. HIGUCHI M. L. Chronic chagasic myocarditis is T.cruzi -antigen and CD8+T cell-dependent (Abstract), *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 91, p 42 RT6, 1996.

En la próstata normal y en la hiperplasia nodular, estas células se encuentran en toda la glándula, en forma aislada o en pequeños grupos, y en las proximidades de la uretra, se localizan entre las células epiteliales acinadas y la membrana basal, y también en el estroma en relación con terminaciones nerviosas.

Poseen gránulos argirófilos y argentafíres en el citoplasma apical, y prolongaciones citoplasmáticas dirigidas hacia la luz acinar o uretral.

En el estroma se presentan aisladas y con prolongaciones citoplasmáticas dendríticas o acinadas.

In this study, there are 23 prostatic disorders: 11 nodular hyperplasias and 12 adenocarcinomas, and also areas of normal gland.

The objective is the morphologic identification of these cells with silver impregnation technique, in normal tissue, nodular hyperplasia and adenocarcinoma.

In normal gland and nodular hyperplasia, the MC cells can be seen along most of the gland or near the urethra, solitary or in small clusters.

These cells are located between acinar epithelium cells and basement membrane, but