



Tema Libre

Implicancia de la Persistencia del *T. cruzi* en la Miocardiopatía Chagásica Crónica

Lorena Micucci¹; Carolina Bazán¹; Romina Fauro¹; Fernanda Triquel⁴; Lo Presti Silvina^{1,2}; Alejandra Báez^{1,2}; Mariana Strauss¹; Gaston Camino¹; Patricia Paglini^{1,3}; Walter Rivarola^{1,3}

1. Cátedra de Física Biomédica, Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba.
2. IICSHUM. Universidad Nacional de La Rioja.
3. Cátedra de Física Biomédica, Escuela de Medicina, Universidad Nacional de la Rioja.
4. Cátedra de Biología Celular, Histología y Embriología, Facultad de Ciencias Médicas – Universidad Nacional de Córdoba.

Resumen

Los mecanismos por los cuales los pacientes con infección crónica desarrollan la Enfermedad de Chagas no son completamente conocidos. Se ha planteado la posibilidad de una patogenia autoinmune, aunque existen dudas acerca de que el mecanismo autorreactivo sea el único responsable de las lesiones cardíacas. Para otros, la persistencia del parásito generaría una reactividad inflamatoria crónica, y ésta induciría una respuesta inmune cuyo blanco sería el propio tejido del huésped. Estudiamos la importancia de la persistencia del parásito como factor determinante en generar miocardiopatía. Se infectaron 139 ratones albinos suizos con 50 tripomastigotes/ratón de *T. cruzi* cepa Tulahuen a los que se les realizó electrocardiogramas (ECG), parasitemia, sobrevida, histopatología, inmunofluorescencia y PCR a los 90, 180, 270 y 360 días post infección (dpi). Los datos fueron analizados de acuerdo a la naturaleza de la variable en estudio (ANAVA, datos categóricos y test de comparaciones múltiples). Se consideró un nivel de significación de $p < 0.05$. La máxima parasitemia se observó a los 21 dpi y se negativizó a los 42dpi. Las alteraciones ECG en ratones infectados fueron: a los 90dpi 50% y 360dpi 67% y en ratones sin infectar sólo 9,68%. Infiltrados inflamatorios se observaron a lo largo de toda la infección, con un mayor porcentaje en aquellos ratones con alteraciones electrocardiográficas; se verificó la presencia de parásitos en músculo esquelético y cardíaco hasta los 360 dpi mediante la técnica de inmunofluorescencia y PCR. La mayor mortalidad se produjo a los 21dpi y un porcentaje de sobrevida del 10% al final de la infección. Estos resultados muestran la presencia de parásitos en tejidos cardíaco y esquelético durante toda la infección y que en la fase crónica indeterminada (ratones sin alteraciones ECG) ya podemos encontrar infiltrados inflamatorios en miocardio.

Introducción

La enfermedad de Chagas es una zoonosis causada por el *T. cruzi*, parásito protozoario que se localiza exclusivamente en el continente americano, desde el sur de Estados Unidos hasta Argentina y Chile. De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, la Trypanosomiasis Americana o Enfermedad de Chagas continúa teniendo la mayor carga de morbimortalidad de origen parasitario en el continente Americano, a pesar de importantes avances en el control de la transmisión vectorial y transfusional del *Trypanosoma cruzi* (WHO, 2002). Se trata de una patología con un intrincado problema económico, ecológico y político-social, que ha sido considerada como una enfermedad socioeconómica típica, inseparable de la pobreza y el subdesarrollo, por la vinculación entre la proliferación de los insectos vectores y las viviendas precarias donde se pueden alimentar y multiplicar (Catalá y col, 2004). La forma más frecuente de transmisión del parásito es por vía vectorial, siendo el *Triatoma infestans* el principal vector en nuestro medio (Atías y Neghme, 1991). Esta enfermedad cursa con manifestaciones clínicas variables: una etapa aguda, una crónica asintomática y otra crónica cardíaca o crónica digestiva (Apt B.W. 2008). La enfermedad de Chagas aguda usualmente afecta a niños o adultos jóvenes en las áreas endémicas. En esta etapa se produce una elevada proliferación intracelular del parásito (Andrade y col, 2000). Entre 10 y 30 años después de la infección aguda, un porcentaje no mayor del 30 %, aunque variable según la zona geográfica, mostrará signos clínicos, electrocardiográficos, ecocardiográficos y radiológicos de compromiso miocárdico y/o gastrointestinales (megaesófago o megacolon) (Días JCP 1995). Los mecanismos involucrados en la fisiopatogenia y en la de la progresión de la miocardiopatía chagásica crónica son aún poco claros; las hipótesis que intentan dar una explicación son: la persistencia del parásito en el corazón y otros órganos de los pacientes en cualquiera de las fases de la infección (Duthie y col, 2007) la respuesta autoinmunitaria, es decir que anticuerpos anti *T. cruzi* serían los responsables del daño cardíaco (Leon y Engman, 2001; Kierszenbaum, 2005), y cardiotoxicidad por catecolaminas (Dávila y col, 2002; Dávila y col, 2005). Es probable que una conjunción de todas las hipótesis contribuyan a explicar la fisiopatogenia de esta miocardiopatía. La presencia del parásito desencadenaría un proceso inflamatorio y autoinmunitario de daño, que culminaría con focos de fibrosis de acumulación progresiva (Sosa RR.1997). Algunos investigadores sostienen, mediante técnicas más sensibles de detección del parásito, que la presencia de éste en el tejido miocárdico sería la principal causa de la miocardiopatía chagásica, ya que se ha probado su presencia por la técnica de PCR en la fase crónica in situ (Salomone O.A. 2000).

Objetivos

El objetivo de este trabajo fue demostrar la persistencia de *T. cruzi* en todas las fases de la Enfermedad de Chagas Experimental.

Materiales y Métodos

- Animales: Se utilizaron 137 ratones Albinos suizos adultos peso promedio $30 \pm 1g$.
- Parásitos: Tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* de la cepa Tulahuen.
- Infección: la infección se realizó con 50 tripomastigotes / animal inoculados por vía intraperitoneal, obtenidos de la sangre heparinizada de ratones infectados para mantener la cepa de parásitos. El estudio de la evolución de la enfermedad de Chagas experimental se llevó a cabo a través de parasitemia, sobrevida, electrocardiografía, histopatología e inmunofluorescencia a lo largo de toda la infección experimental (90, 180, 270 y 360 días post infección –dpi-).
- Parasitemia: Determinada en Cámara de Neubauer en muestras de sangre de la cola de los ratones cada 7 días.
- Sobrevida: Fue monitoreada diariamente.
- Electrocardiografía (ECG): Se realizó antes de la infección y a los 90, 180, 270 y 360 d.p.i, en electrocardiógrafo CardioCom determinándose las derivaciones unipolares (aVF, aVR y aVL) y bipolares de los miembros (DI, DII y DIII), bajo anestesia con ketamina (10 mg/Kg). Velocidad: 50 mm/s.
- Histopatología: Los corazones y el músculo esquelético fueron disecados. El órgano se fijo en buffer (pH 7.0) 10% de formol y fue embebido en parafina. El tejido se rebano horizontalmente y las rodajas de 5 mm de espesor se tiñeron con la técnica del hematoxylina-eosina y tinción de gomori. Se analizo un total de 50 rodajas de cada grupo. Se examinaron 30 áreas de cada rodaja con un objetivo de 40 X. Se cuantifico las áreas con infiltrados inflamatorios y fibrosis con el programa AxioVision.
- Inmunofluorescencia: Para la visualización de los parásitos en los tejidos. Se utilizaron secciones de tejido de músculo esquelético y cardíaco incubadas con el anticuerpo anti *T. cruzi* y luego con el anticuepo fluorescente y observadas en microscopio de fluorescencia.

A los 90, 180, 270 y 360 d.p.i. luego de realizar electrocardiogramas a los ratones se los dividió en Ratones con alteraciones y Sin alteraciones electrocardiográficas.

Resultados

Parasitemia: En la **figura 1**, se muestra la parasitemia de los ratones a lo largo de toda la infección. Se observa que la parasitemia aumenta hasta llegar a un pico a los 21 d.p.i., y disminuye hasta negativizarse por este método a los 42 d.p.i.

Sobrevida: La mayor mortalidad se produjo a las 21 d.p.i. El porcentaje de sobrevida al final de la infección fue del 10%.

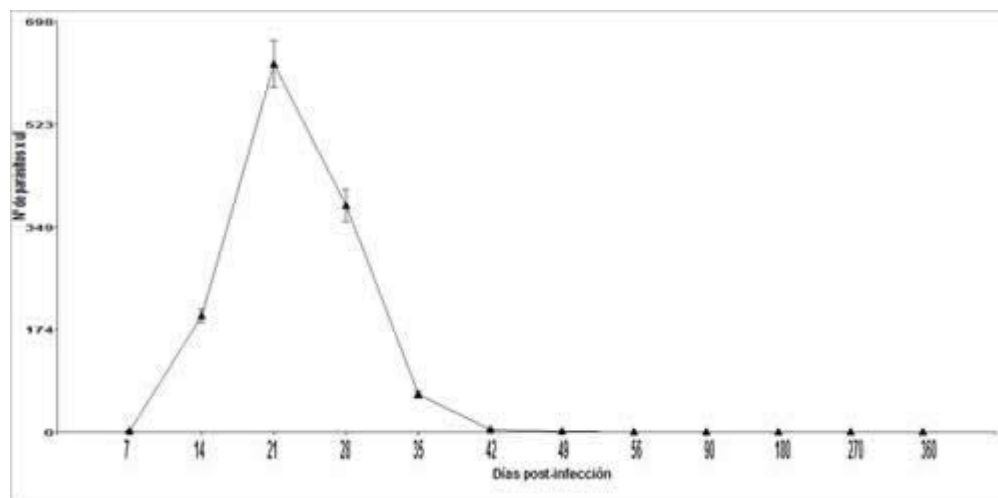


Figura 1. Evolución de la parasitemia de ratones infectados con *T. cruzi*, cepa tulahuen.

Electrocardiografía: Los estudios electrocardiográficos se llevaron a cabo a los 90, 180, 270 y 360 d. p. i. En ellos se analizó la frecuencia cardíaca, la longitud de los segmentos PR (bloqueo aurículo-ventricular) y QRST (bloqueo ventricular), y el eje eléctrico cardíaco. En la **tabla 1**, se muestran los resultados de los parámetros electrocardiográficos analizados donde podemos observar que el grupo de ratones infectados presentaron un mayor porcentaje de alteraciones electrocardiográficas.

Las alteraciones electrocardiográficas observadas fueron bloqueos intra-ventriculares, bloqueos aurículo-ventriculares y otros tipos de arritmias.

Parámetros / Grupos	Frecuencia cardiaca (Latidos/min.)	Eje eléctrico (grados)	Complejo QRST (segundos)	Segmento PR (segundos)	% de alteraciones
No infectados (n=30)	555.54 ± 13.99	66.68 ± 6.49	0.03 ± 0.0007	0.02 ± 0.0009	0
90 d.p.i (n=18)	540.31 ± 14.55	24.38 ± 8.56	0.028 ± 0.001	0.03 ± 0.0015	50
180 d.p.i (n=25)	580 ± 14	40 ± 7	0.016 ± 0.001	0.026 ± 0.001	64
270 d.p.i (n=25)	570 ± 20	45 ± 10	0.017 ± 0.001	0.027 ± 0.001	65
360 d.p.i (n=25)	569 ± 29	38 ± 15	0.015 ± 0.001	0.024 ± 0.001	67

Tabla 1. Análisis electrocardiográfico de ratones sin infectar e infectados por *T. cruzi*, cepa Tulahuen.

Histopatología: En la **figura 2** se representan los resultados de histopatología en miocardio analizados en ratones con y sin alteraciones electrocardiográficas donde se observó la presencia de infiltrados inflamatorios a lo largo de toda la infección. Además se observó un mayor porcentaje de infiltrados inflamatorios en aquellos ratones con alteraciones electrocardiográficas (**figura 3a y 3b**). En la **figura 4** se representan los resultados de histopatología en músculo esquelético analizados en ratones con y sin alteraciones electrocardiográficas. Se observó un alto porcentaje de infiltrados inflamatorios a lo largo de toda la infección en ambos grupos de ratones, siendo mayor en el grupo que presentan alteraciones electrocardiográficas (**figura 5 a y b**).

Inmunofluorescencia: Al analizar inmufluorescencia para visualizar los parásitos en miocardio y músculo esquelético, se pudo observar la presencia de los mismos a lo largo de toda la infección en músculo esquelético y solo a los 90 d.p.i. en miocardio (**figura 6**).

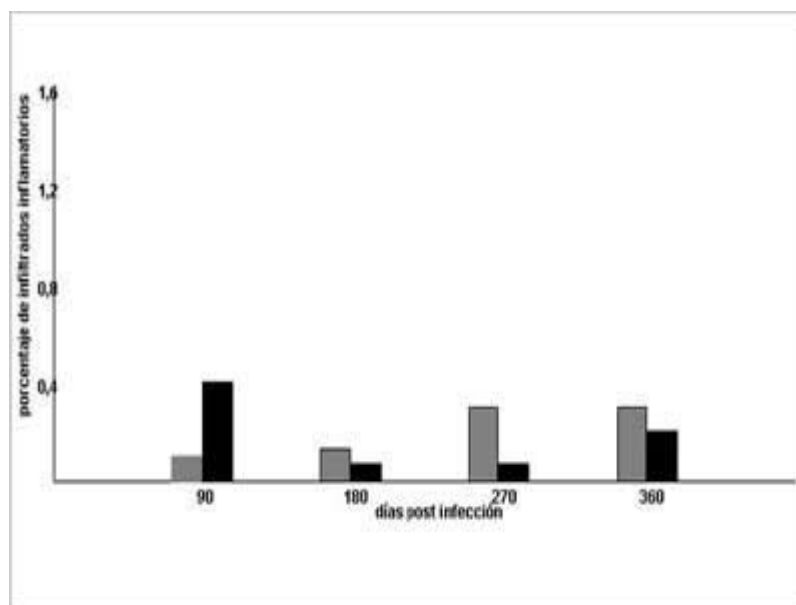


Figura 2. Porcentaje de infiltrados inflamatorios en Miocardio de ratones con alteraciones (♣) y sin alteraciones (♣) electrocardiográficas, infectados con *T. cruzi*.

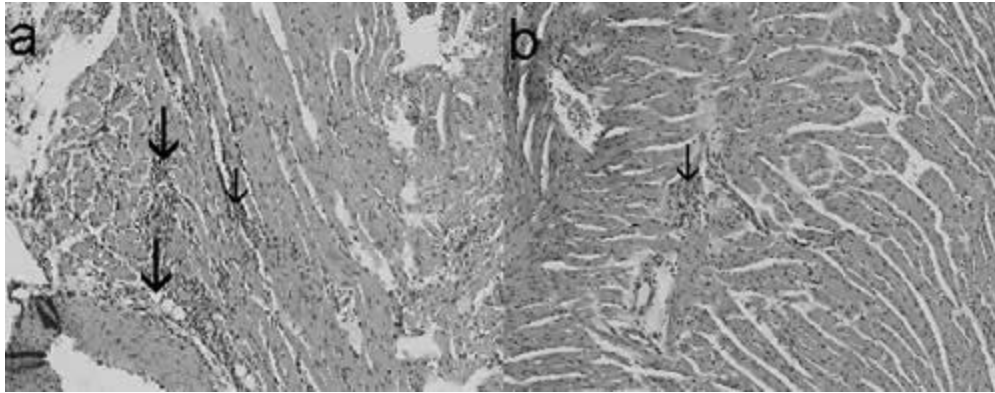


Figura 3. a) Miocardio de ratón infectado con *T. cruzi* a los 180 d. p. i. con alteraciones en el ECG (40X).
b) Miocardio de ratón infectado con *T. cruzi* a los 180 d. p. i. sin alteraciones en el ECG (40X).

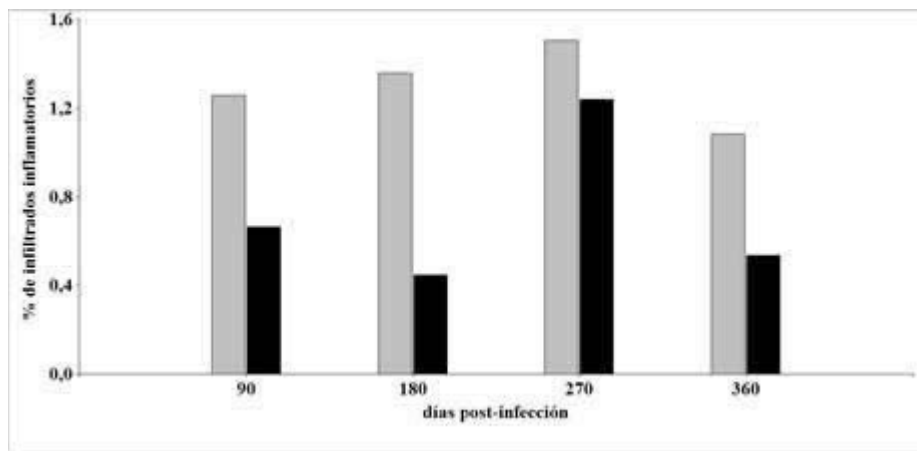


Figura 4. Porcentaje de infiltrados inflamatorios en Músculo Esquelético de ratones con alteraciones (☉) y sin alteraciones (☐) electrocardiográficas, infectados con *T. cruzi*.

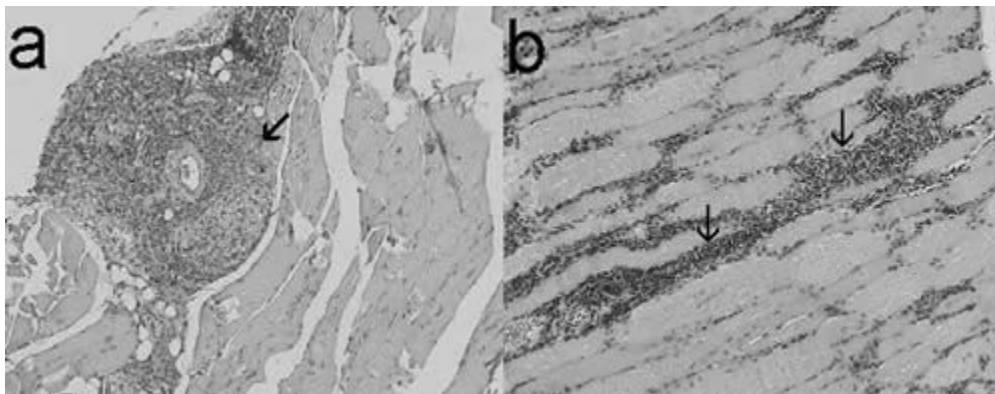


Figura 5. a) Músculo esquelético de ratón infectado con *T. cruzi* a los 90 d. p. i. con alteraciones en el ECG (20X),
b) Músculo esquelético de ratón infectado con *T. cruzi* a los 90 d. p. i. sin alteraciones en el ECG (20X)

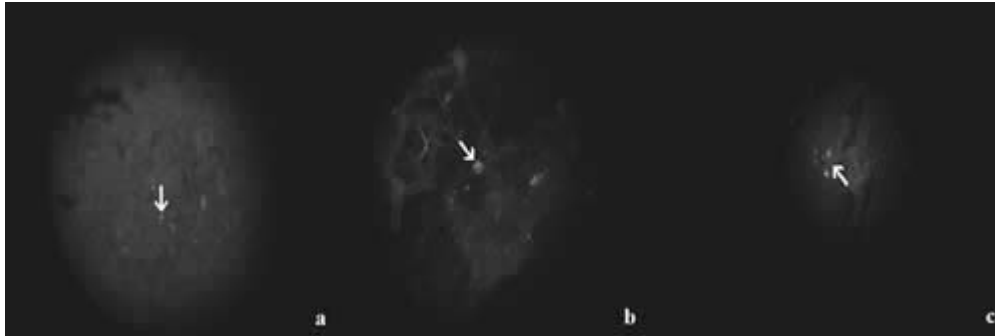


Figura 6. a) Inmunofluorescencia anti *T. cruzi* en músculo cardíaco de ratones infectados a los 90 d. p. i
 b) Inmunofluorescencia anti *T. cruzi* en músculo esquelético de ratones infectados a los 90 d. p. i.,
 c) Inmunofluorescencia anti *T. cruzi* en músculo esquelético de ratones infectados a los 270 d.p.i

Discusión

La Enfermedad de Chagas, cuyo agente etiológico es el *Trypanosoma cruzi*, constituye una importante causa de falla cardíaca. Cerca del 30% de los individuos infectados desarrollan cardiopatía chagásica crónica, la forma más severa de la enfermedad (Prata A. 2000). La patogenia de la progresión de la ECH es aún desconocida (Lages-Silva E. y col 2001), para algunos investigadores la falta de correlación entre la visualización microscópica del parásito y los intensos infiltrados de células mononucleares inflamatorias ricas en células T en tejidos afectados durante la fase crónica de la enfermedad de Chagas, ha llevado a la formulación de la hipótesis autoinmune (Golgher D, Gazzinelli RT. 2004). Sin embargo la persistencia del parásito en el ser humano evidenciado por la reactivación de la parasitemia en pacientes inmunosuprimidos (Riarte A y col. 1999), la asociación de las lesiones cardíacas con antígenos parasitarios (DOVila-Gomez y col. 1998) y la regresión de las lesiones cardíacas en la infección experimental murina sugieren que el parásito parece jugar un rol fundamental (Andrade SG y col 1991). El rol patogénico directo del parásito ha generado fuerte apoyo luego de la aplicación de nuevas técnicas inmunohistoquímicas y moleculares, las que han evidenciado una estrecha correlación entre la presencia del parásito y las lesiones tisulares (Lages-Silva E y col 2001)(Jones MJ y col 2002). En el presente trabajo se encontraron parásitos a lo largo de los 360 días post infección (d.p.i.) en músculo esquelético y en corazón a los 90 d.p.i coincidiendo, en este caso con los mayores porcentajes de alteraciones histopatológicas. Estos hallazgos coinciden con otros investigadores donde observan nidos de amastigotes de *T. cruzi* en el corazón y músculo esquelético (Moreno, Elio A y col 2006). Hay mayor porcentaje de infiltrados inflamatorios en músculo esquelético que en miocardio. Estos datos coinciden con los encontrados en humanos, donde esta enfermedad produce alteraciones en los músculos esqueléticos periféricos, lo cual puede contribuir a la incapacidad funcional que presentan muchos de los enfermos chagásicos. Es posible que al estar alterada la microcirculación, el riego y la oxigenación de las fibras musculares estén disminuidos, originando cambios metabólicos anaeróbicos y comprometiendo la función muscular (Montes de Oca, María y col 2007). Observamos además en todos los ratones, con alteraciones electrocardiográficas o sin ellas, cambios histopatológicos, pero siendo la presencia de infiltrados y fibrosis menor en los ratones con electrocardiogramas normales.

Conclusiones

Por lo tanto podemos concluir que el *T. cruzi* se encontraría presente a lo largo de toda la Enfermedad de Chagas, alojado en músculo cardíaco y esquelético y que podrían estar relacionados con los daños histopatológicos observados y que estos producirían alteraciones electrocardiográficas.

BIBLIOGRAFIA

1. Andrade SG, Stocker-Guerret S, Pimentel AS, Grimaud JA. Reversibility of cardiac fibrosis in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*, under specific chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1991 Apr-Jun;86(2):187-200.
2. Andrade Z. Patología da doença de Chagas. En Brener Z, Andrade Z, Barral-Netto M. *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas.* 2ª ed., Guanabara-Koogan, Río de Janeiro, p. 201-230. 2000.
3. Apt BW; Heitmann GI; Jercic LMI; Jofré ML; Muñoz C; Noemí HI; San Martín VAM; Sapunar PJ; Torres HM, Zulantay AI. Guidelines for the Chagas disease: Part VI. Antiparasitic treatment for Chagas disease. *Rev Chilena Infectol.* Epub Oct 1;25(5):384-9. (2008).
4. Atias A; Negheme. Enfermedad de Chagas. *Parasitología Clínica* Cap 30. Editorial Mediterránea. 3º Ed.(1991)
5. Dias JCP. Natural history of Chagas' disease. *Arq. Bras. Cardiol.* 65: 359-366 (1995).
6. Catalá S.S., Crocco L.B., Muñoz A., Morales G., Paulone I., Giraldez E., Candioti C., Ripol C. Entomological aspect of Chagas' disease transmisión in the domestic habitat, Argentina. *Rev. Saúde Pública.* 38: 216-222 (2004).
7. Davila DF, Rossell O, Bellabarba GA. Pathogenesis of chronic Chagas' heart disease: parasite persistence and autoimmune responses versus cardiac remodelling and neurohormonal activation. *Int J Parasitol* 32: 107-109. 2002.
8. Dávila-Spinetti D.F., Colmenarez-Mendoza H.J. y Lobo-Vielma L. Mecanismos causantes de la progresión del daño miocárdico en

- la enfermedad de Chagas crónica. Rev. Esp. Cardiol. 58: 1007-1009 (2005).
9. Duthie M.S., Kahn M., Zakayan A., White M., Kahn S.J. Immunotherapy Before or During *Trypanosoma cruzi* infection Does Not Exacerbate Parasite-Induced Chronic Inflammation. Clin. Vaccine Immunol. En prensa (2007).
 10. DOVilla-Gomez et al. AMER J Trop Med & Hyg 59: 563-70,1998 Andrade SG et al. Mem Inst Oswaldo Cruz 86:187-200, 1991.
 11. Golgher D, Gazzinelli RT. Innate and acquired immunity in the pathogenesis of Chagas disease. *Autoimm* 2004; 37: 399-409. A Riarte et al. Clin Infect Dis 29: 561-568, 1999. 8.
 12. Jones MJ, Yabsley MJ, Pung OJ, Grijalva MJ. Amplification of *Trypanosoma cruzi* specific DNA sequences in formalin-fixed raccon tissues using polymerase chain reaction. *J Parasitol* 2002; 88: 989-93.
 13. Kierszenbaum F. Where do we stand on the autoimmunity hypothesis of Chagas disease? Trends Parasitol 21: 513-516. 2005.
 14. Lages-Silva E, Crema E, Ramírez LE, Macedo AM, Peña SD, Chiari E. Relationship between *Trypanosoma cruzi* and human chagasic megoesophagus: blood and tissue parasitism. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 65: 435-41.
 15. Leon, J. S.; Engman, D. M.: Autoimmunity in Chagas heart disease. Int. J. Parasitol., 31: 555-561. (2001).
 16. MONTES DE OCA, María, H. TORRES, Sonia, FINOL, Héctor J et al. Alteraciones musculares periféricas en la enfermedad de Chagas. *Gac Méd Caracas*, ene. 2007, vol.115, no.1, p.55-61. ISSN 0367-4762.
 17. Moreno, Elio A; Quintero, Arelis C; Alarcón, Maritza E; Lugo de Yarbu, Ana; Moreno, Stelliana C; Araujo, Sonia A; Borges, Rafael. Research on vertical transmission of *Trypanosoma cruzi* in chronocally infected Wistar rats *Bol. malarial. salud ambient*;46(2):149-160, 2006.
 18. Prata A. Clinical and epidemiological aspect of Chagas disease. *Lancet Inf Dis* 2000; 1: 92-100.
 19. Salomone OA. et al. Prevalence of circulating *Trypanosoma cruzi* detected by polymerase chain reaction in patients with Chagas' cardiomyopathy. *Am. J. Cardiol.* 85: 1274-1276 (2000).
 20. Sosa RR. Se cierra el círculo patogénico en: Estudio Epidemiológico sobre los factores de Riesgo en la Miocardiopatía Chagásica Crónica. Prevención de su desarrollo mediante el tratamiento antiparasitario específico. Tesis Doctoral. Univ. Nac. Cba. 333-336 (1997).
 21. WHO. The World Health Report, 2002 World Health Organization. Geneva. (2002).

Publicación: Octubre 2011

Preguntas, aportes y comentarios serán respondidos por los autores a través de la lista de **Enfermedad de Chagas**.

Llene los campos del formulario y oprima el botón "Enviar".

Ver mensajes: [Septiembre](#) - [Octubre](#)

Preguntas, aportes o comentarios:

Nombre y apellido:

País: [Argentina](#)

Dirección de E-Mail:

Confirmación Dirección de E-Mail: