

Efecto de la IL-1(3 y del TNF-a sobre la multiplicación intracelular del *Trypanosoma cruzi* en cultivos de miocitos cardiacos

MIRIAM POSTAN¹, CECILIA ALBAREDA, BRENDA SCHAERER, LAURA FICHERA¹

RESUMEN

Los mecanismos responsables del desarrollo de las lesiones cardiacas **de la enfermedad de Chagas** no han sido totalmente dilucidados. Estudios recientes han **descrito el aumento de la expresión de** la enzima sintetasa de óxido nítrico (NOS) en miocitos cardiacos y células inflamatorias durante la infección experimental con *T. cruzi*, en asociación con las citoquinas IL-1(3 y TNF-a, sugiriendo su participación en la patogénesis de la miocarditis **chagásica**. **En este trabajo** demostramos que las citoquinas IL-1(3 y TNF-a **ejercen** un efecto inhibitorio sobre la multiplicación parasitaria intracelular e inducen la liberación progresiva de óxido nítrico (NO) **en cultivos de miocitos cardiacos infectados con *T. cruzi* in vitro**. **La importancia del NO sobre la multiplicación parasitaria** fue confirmada por la neutralización de su efecto inhibitorio por el L-NAME. REV ARGENT CARDIOL 2000; 68: 827-830.

Palabras clave Enfermedad de Chagas - IL-1(3 - TNF-a - NOS - *T. cruzi* - Proliferación

INTRODUCCION

Diferentes mecanismos -inmunológicos, parasitológicos, neurológicos y vasculares- se han sugerido como causales del desarrollo de la miocardiopatía que ocurre en la fase crónica de la enfermedad de Chagas. En esta etapa, *T. cruzi* infecta y se multiplica en el citoplasma de células de diferentes tejidos, aunque es en las células musculares cardiacas donde se lo encuentra con mayor frecuencia. Estudios sobre miocitos cardiacos infectados *in vitro* han demostrado que la multiplicación intracelular del parásito es inhibida por linfocitos de ratones infectados por *T. cruzi* y sus productos. (1) En los macrófagos, la actividad tripanocida es ejercida a través de la producción de óxido nítrico (NO), estimulada por el IFN- γ . (2, 3) La importancia del NO en la resistencia natural contra *T. cruzi* fue demostrada por la exacerbación de la infección murina luego del tratamiento con N-nitro-L arginina-metil ester (L-NAME), un competidor del NO. (4, 5) El NO es un mediador esencial para una variedad de funciones cardiacas,

aunque también ha sido involucrado en la disfunción miocárdica asociada con diferentes patologías. Los miocitos cardiacos expresan la enzima sintetasa del NO (NOS), en forma constitutiva (cNOS) e inducida (iNOS) en respuesta al estímulo por diferentes citoquinas. (6-8) Estudios recientes han demostrado el aumento de la expresión de la NOS en miocitos y células de los infiltrados inflamatorios cardiacos durante la infección experimental por *T. cruzi*, en asociación con las citoquinas IL-1(3 y TNF-a, lo cual sugiere su participación en la patogénesis de la miocarditis chagásica. (9, 10) En este trabajo describimos la respuesta *in vitro* de los miocitos cardiacos al estímulo con IL-1(3 y TNF-a, en relación con el control de la multiplicación intracelular de *T. cruzi* y con la producción de NO.

MATERIAL Y METODO

Preparación de miocitos cardiacos

Se prepararon cultivos de miocitos cardiacos a

Instituto Nacional de Parasitología "Dr. Mario Fatala Chabén", ANLIS/MalbrAn, Buenos Aires, Argentina

¹ Miembros de la Carrera de Investigador de CONICET

Trabajo recibido para su publicación: 8/00. Aceptado: 9/00

Dirección para separatas: Dra. Miriam Postan, Instituto Nacional de Parasitología "Dr. Mario Fatala Chabén", Av. Paseo Colón 568, (1063) Buenos Aires, Argentina - E-mail: mpostan@mail.retina.ar

Este trabajo fue financiado por MSyAS y FONCYT.

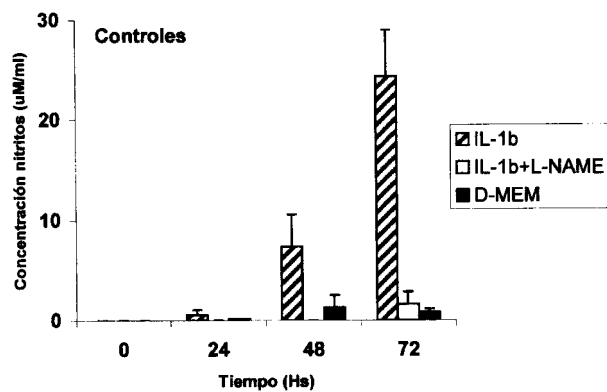
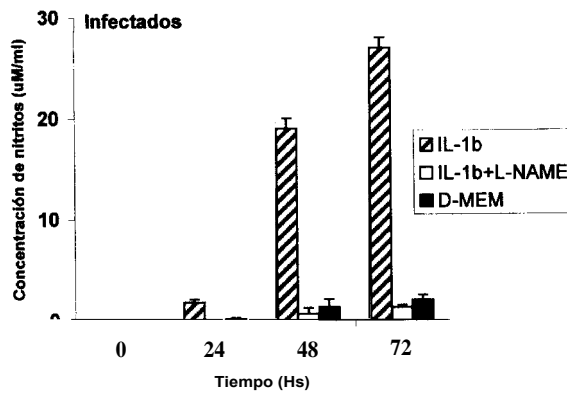


Fig. 1. Representación grafica de la concentración de nitritos en el sobrenadante de cultivos de miocitos cardíacos infectados por *T. cruzi* y controles no infectados, durante el tratamiento con IL-1p y/o L-NAME.

partir de ventriculos de ratas Wistar neonatas. (11) Los animales fueron sacrificados bajo ligera anestesia con titer, y los corazones se sumergieron brevemente en una solución de alcohol etílico y medio de cultivo DMEM estéril para limitar el crecimiento de células de pericardio y endocardio. El tejido miocárdico se disgregó mediante digestión enzimática con tripsina al 0,2% en medio de Hanks a 37°C y las células se resuspendieron en DMEM suplementado con suero fetal bovino y de caballo. La suspensión celular se incubó a 37°C durante 1 hora en frasco de cultivo, para permitir la adherencia de células no miocíticas (principalmente fibroblastos). Luego, las células no adheridas se colocaron en placas de cultivo de 24 pocillos que contenían cubreobjetos de 12 mm de diámetro y se sembraron 1×10^5 células/pocillo.

Infección y tratamiento de los cultivos de miocitos cardíacos

Se infectaron los cultivos de miocitos durante 3 horas con tripomastigotes de cultivo del clon de *T. cruzi* Sylvio-X10/4, en una proporción de 5:1 parásitos/célula. Luego, los cultivos se trataron con 10 ng/ml de IL-1(3, 100 ng/ml de TNF-a, 10 ng/ml de

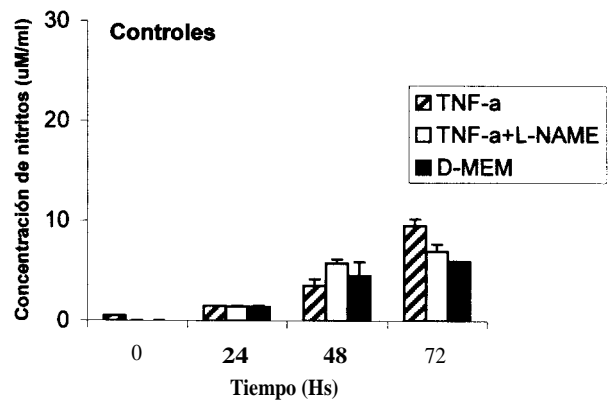
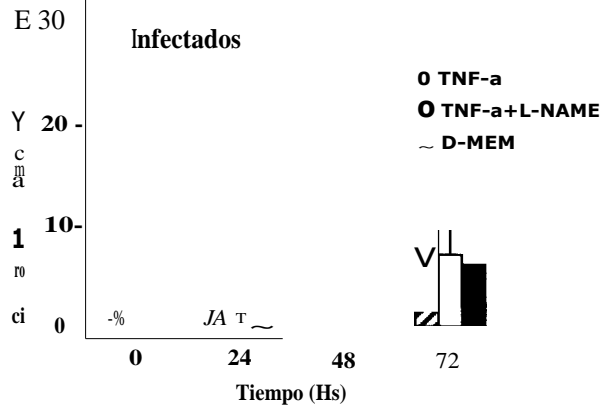


Fig. 2. Representación grafica de la concentración de nitritos en el sobrenadante de cultivos de miocitos cardíacos infectados por *T. cruzi* y controles no infectados, durante el tratamiento con TNF-a y/o L-NAME.

IL-1 (3 o 100 ng/ml de TNF-a + 1 mM de L-NAME, 1 mM de L-NAME sin citoquinas o con medio de cultivo sin agregados como control. Se realizaron tres experimentos para cada tratamiento, por lo que se incluyeron muestras triplicadas para cada uno de ellos. Los sobrenadantes de los cultivos se recolectaron a las 24, 48 y 72 horas de la infección, con reposición del medio con los tratamientos correspondientes. La concentración de nitritos en los sobrenadantes se midió mediante la reacción de Griess como un índice de producción de NO por los miocitos cardíacos. Luego de las 72 horas de la infección, las células se fijaron con metanol, se tincieron con colorante de Giemsa y se evaluaron con microscopio óptico. La densidad de células parasitadas se determinó en un total de 300 células/tratamiento en cada experimento. Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente con la prueba de la t de Student. Valores de $p < 0,05$ se consideraron significativos.

RESULTADOS

Este trabajo muestra que el tratamiento con IL-1p

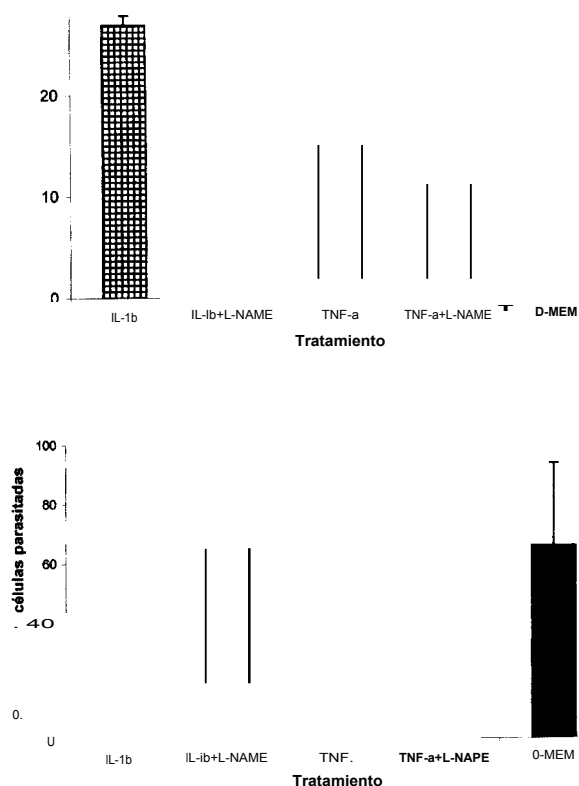


Fig. 3. Representación grafica de la concentración de nitritos y densidad parasitaria a las 72 horas del cultivo de miocitos cardiacos infectados por *T. cruzi* y tratados con IL-1p, TNF-a y/o L-NAME.

y TNF-a indujo la liberación progresiva de NO en el sobrenadante de los cultivos de miocitos cardiacos infectados por *T. cruzi* y de los controles (Figuras 1 y 2). Las concentraciones de nitritos alcanzados por los cultivos estimulados con IL-1p fueron significativamente mayores que las concentraciones de los cultivos estimulados con TNF-a. La producción de NO en los cultivos no estimulados con citoquinas se mantuvo en los niveles basales, sin que este resultado se modificara por la infección. El agregado de L-NAME con las citoquinas inhibió la producción de NO, tanto en los cultivos infectados como en los controles. Sin embargo, el nivel de inhibición de la producción de NO fue menor en los cultivos tratados con TNF-a que en los cultivos tratados con IL-1p, independientemente de la infección.

El numero de celulas con nidos de amastigotes en los cultivos tratados con IL-1p y TNF-a fue significativamente menor que en los controles infectados no tratados, sin diferencias importantes entre ambos tratamientos (Figuras 3 y 4). La densidad de celulas parasitadas en los cultivos tratados con IL-1p y TNF-a a los cuales se les agregó el L-NAME fue similar a la de los cultivos infectados controles no tratados con las citoquinas.



Fig. 4. Fotomicrograffas de miocitos cardiacos a las 72 horas posinfeccion por *T. cruzi* tratados con TNF-a (mitad superior) y no tratados (mitad inferior).

DISCUSION

Los resultados de este estudio demuestran que las celulas musculares cardiacas infectadas por *T. cruzi in vitro* conservan la capacidad de producir NO cuando son estimuladas con las citoquinas proinflamatorias IL-1p y TNF-a, de manera similar a lo observado en otros sistemas cardiacos experimentales. (6) Varios autores hallaron que la liberación local de citoquinas puede inducir la expresi3n de iNOS en miocitos cardiacos durante el rechazo de injerto miocardiaco, infarto, miocarditis y miocardiopatias idiopaticas. (7, 12-19) No obstante que en la literatura existen evidencias de actividad cNOS e iNOS en los miocitos cardiacos, asi como del efecto funcional que el NO ejerce sobre ellos, el papel de estas molculas en la infecci3n por *T. cruzi* aun no se conoce.

En esta investigaci3n demostramos que las citoquinas IL-1p y TNF-a, producidas localmente por las celulas inflamatorias durante la infecci3n por *T. cruzi in vivo*, ejercen un efecto modulador sobre la multiplicaci3n del parasi3to dentro del citoplasma de los miocitos cardiacos *in vitro*. La correlaci3n inversa entre la producci3n de NO y la carga parasitaria indica que estas citoquinas ejercen su efecto modulador, en parte, a traves de la producci3n de NO. La

importancia de este metabolito sobre la multiplicación parasitaria se confirmó por la neutralización de su efecto inhibitorio por el L-NAME. En conclusión, la célula muscular cardíaca tiene la capacidad de participar activamente en la respuesta del organismo a la infección experimental por *T. cruzi*, tanto en la resistencia natural contra el parásito como en el desarrollo de la patología cardíaca.

SUMMARY

EFFECT OF IL-1(3 AND TNF- α ON THE INTRACELLULAR MULTIPLICATION OF *TRYPANOSOMA CRUZI* IN CULTURES OF CARDIAC MYOCYTES

The mechanisms responsible for the development of the cardiac lesions characteristic of Chagas' disease remain mainly unknown. Recent studies described an increased expression of nitric oxide synthase (NOS) in cardiac myocytes and inflammatory cells during *T. cruzi* infection, in association with the cytokines IL-1(3 and TNF- α suggesting a role in the pathogenesis of the chagasic cardiomyopathy. In this work, we demonstrate that IL-1(3 and TNF- α exert an inhibitory effect on the intracellular multiplication of *T. cruzi* and induce the production of nitric oxide (NO) in cultures or cardiac myocytes infected with *T. cruzi* in vitro. The relevance of NO on parasite multiplication was confirmed by neutralizing its inhibitory effect with L-NAME.

Key words Chagas' disease - IL-1(i - TNF- α - NOS - *T. cruzi* - Proliferation

BIBLIOGRAFIA

1. Reyes L, Chinchilla M. Growth inhibition of *T. cruzi* in culture murine myocardial cells mediated by a specifically induced lymphokines. *Infect Immun* 1987; 55: 1513-1516.
2. Muñoz-Fernández MA, Fernández MA, Fresno M. Activation of human macrophages for the killing of intracellular *T. cruzi* by TNF- α and IFN- γ through a nitric oxide-dependent mechanism. *Immunol Letters* 1992; 33: 35-40.
3. Metz G, Carlier Y, Way B. *Trypanosoma cruzi* upregulates nitric oxide release by IFN preactivated macrophages, limiting cell infection independently of the respiratory burst. *Parasite Immunol* 1993; 15: 693-699.
4. Petray P, Rottenberg M, Grinstein S y col. Release of nitric oxide during the experimental infection with *T. cruzi*. *Parasite Immunol* 1994; 16: 193-199.
5. Vespa GNR, Cunha FQ, Silva JS. Nitric oxide is involved in the control of *T. cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. *Infect Immun* 1994; 62: 5177-5182.
6. Balligan JL, Ungureanu-Longrois D, Simmons WW y col. Cytokine-inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in cardiac myocytes. Characterization and regulation of iNOS expression and detection in single cardiac myocytes in vitro. *J Biol Chem* 1994; 269: 27580-27588.
7. Barry WH. Mechanism of immune-mediated myocyte injury. *Circulation* 1994; 89: 2421-2432.
8. Matsumori A. Cytokines in myocarditis and cardiomyopathies. *Curr Opin Cardiol* 1996; 11: 302-309.
9. Chandrasekar B, Melby PC, Troyer DA y col. Temporal expression of pro-inflammatory cytokines and inducible nitric oxide synthase in experimental acute chagasic cardiomyopathy. *Am J Pathol* 1998; 152: 925-934.
10. Huang H, Chan J, Wittner M y col. Expression of cardiac cytokine and inducible form of nitric oxide synthase (NOS2) in *Trypanosoma cruzi*-infected mice. *J Mol Cell Cardiol* 1999; 31: 75-88.
11. Ellingsen O, Davidoff AJ, Prasad SK y col. Adult rat ventricular myocytes cultured in defined medium. Phenotype and electromechanical function. *Am J Physiol* 1993; 265 (Heart Circ Physiol 34): H747-754.
12. Dallman MJ, Larsen CP, Morris PJ. Cytokine gene transcription in vascularized organ grafts. Analysis using semiquantitative polymerase chain reaction. *J Exp Med* 1991; 174: 493-496.
13. Frangogiannis NG, Youker KA, Rossen RD y col. Cytokines and microcirculation in ischemia and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* 1998; 30: 2567-2576.
14. Lane JR, Neuman DA, Lafond-Walker A y col. Role of IL-1 and tumor necrosis factor in Coxsackie virus-induced autoimmune myocarditis. *J Immunol* 1993; 151: 1682-1690.
15. Lange LG, Schreiner GF. Immune mechanism of cardiac disease. *N Engl J Med* 1994; 330: 1129-1135.
16. Meldrum DR, Meng X, Dinarello CA y col. Human myocardial tissue TNF- α expression following acute global ischemia in vivo. *J Mol Cell Cardiol* 1998; 10: 1683-1689.
17. Satoh M, Nakamura M, Tamura G y col. Inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor alpha in myocardium in human dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 1997; 29: 716-724.
18. Shioi T, Matsumori A, Sasayama A. Persistent expression of cytokine in the chronic stage of viral myocarditis in mice. *Circulation* 1996; 94: 2930-2937.
19. Xang X, Chowdhury N, Ci B y col. Induction of myocardial nitric oxide synthase by cardiac allograft rejection. *J Clin Invest* 1994; 96: 714-721.