

Enfermedad de Chagas: evidencia de engrosamiento de las membranas basales (¿antilaminina?) en miocitos y capilares miocárdicos con microscopía electrónica*

RUBEN STORINO, RICARDO BEIGELMAN**, JOSE MILEI, VICTOR FERRANS

Hospital "Juan A. Fernández" y CARDIOPSIS, Buenos Aires, Argentina, e Institutes of Health, Heart, Lung and Blood Institutes, Bethesda, Mariland, USA

* Trabajo elegido Congreso "Cardiología '88" y Premio "Salvador Mazza" '89

** Para optar a Miembro Titular de la Sociedad Argentina de Cardiología

Trabajo recibido para su publicación: 3/89. Aceptado: 4/89

Dirección para separatas: Dr. José Milei, CARDIOPSIS, Tucumán 2163, 4º "B", (1050) Buenos Aires, Argentina

Al recuerdo de nuestro amigo el Dr. Patricio Miguel Cossio, por habernos motivado en la investigación de la enfermedad de Chagas desde 1976, y en reconocimiento a su labor como uno de los pioneros en el estudio de la teoría inmunológica de la patogenia de esta enfermedad.

J.M. - R.S.

La miocardiopatía chagásica crónica (MChCr) constituye la miocarditis crónica más frecuente en el mundo^{1,2} y obviamente es la manifestación más común y grave en la evolución natural de la enfermedad.

Se conocen en profundidad la fase inicial de infestación parasitaria (etapa aguda), la fase de remisión y latencia (etapa subclínica o indeterminada) y la fase progresiva de lesión cardíaca (etapa crónica).^{3,4} Sin embargo la patogenia de la etapa crónica es poco conocida, pues cursa con muy bajo nivel de parasitismo y los infiltrados linfocitarios y de células mononucleares y las extensas áreas de fibrosis son los hallazgos más comunes en el miocardio.

Estudios inmunohistoquímicos realizados en biopsias de pacientes chagásicos crónicos han demostrado depósitos de inmunoglobulinas en el intersticio y en la superficie externa de miocitos y capilares cardíacos⁵ y músculo esquelético.⁶ Mientras que en el estudio ultraestructural miocárdico sólo se han observado cambios inespecíficos como hipertrofia y degeneración de los miocitos y fibrosis intersticial, tanto en los estudios en pacientes chagásicos crónicos^{7,8} como en animales de experimentación con infección chagásica crónica.⁹

A principios del año 1982 demostramos, utilizando los métodos de la inmunoperoxidasa y de la inmunofluorescencia en biopsias endomiocárdicas (BEM) de pacientes con MChCr, la presencia de depósitos de IgG, IgA, IgM y

C₃ en intersticio, endocardio, capilares y superficie externa de miocitos.¹⁰ El depósito de estas inmunoglobulinas, junto al complemento sobre las paredes de los capilares y los sarcolemas de las fibras miocárdicas, sugirió la presencia del llamado anticuerpo antilaminina, dado que éste no es otra cosa que una IgG.^{10,11}

Por ese entonces, Ana Szarfman, trabajando en los Estados Unidos, demostró que el suero de pacientes y de monos infectados con *T. cruzi* poseía anticuerpos antilaminina (la laminina es una glicoproteína que une las membranas basales a las estructuras vecinas), por lo que sugirió que dichos anticuerpos se producirían en el huésped como respuesta a un estímulo de alguna molécula similar a la laminina presente en la cubierta del parásito.^{12,13}

Comunicaciones previas, durante los años 1985 y 1986, nos permitieron conocer los estudios preliminares desarrollados en Venezuela por Carrasco y colaboradores, donde se sugiere que existiría una correlación entre los títulos de anticuerpos antilaminina y la gravedad de la miocardiopatía chagásica.¹⁴

El cúmulo de información obtenida hasta ese momento nos llevó a obtener sangre de nuestros enfermos chagásicos para determinar la presencia del anticuerpo antilaminina. Las observaciones preliminares realizadas por Denduchis y Lustig muestran en nuestros pacientes títulos altos de anticuerpos antilaminina en comparación con los no chagásicos. Esto también

fue sugerido en otras publicaciones.^{15, 16}

Lo descripto hasta el momento corresponde al componente humoral de la teoría inmunológica de la fisiopatogenia de la MChCr. Con respecto al componente celular, se ha descripto clásicamente al infiltrado de la MChCr como compuesto por linfocitos y plasmocitos.³ Además, los linfocitos han sido descriptos como *killer* o "asesinos", sugiriendo fuertemente su acción destructora *in vivo* de las fibras miocárdicas.^{4, 6}

Distintos estudios, entre ellos los de Kierszenbaum y colaboradores,¹⁷ utilizando anticuerpos monoclonales específicos para eosinófilos, demostraron que la acumulación, activación y degranulación de los mismos pueden contribuir también al daño miocárdico en la MChCr.

Estos hallazgos, sumados a los nuestros¹⁰ y a los de Szarfman y colaboradores,¹² nos llevaron a estudiar con microscopía electrónica las membranas basales de pacientes chagásicos crónicos¹⁸ y a realizar estudios con microscopía óptica, valoraciones morfométricas, técnica de inmunoperoxidasa para IgG, IgM y C₃ y avidina-extravidina para anticuerpo panleucocitario en 19 BEM y 3 aneurismas ventriculares izquierdos (AVI) resecados quirúrgicamente.

En definitiva, en este trabajo se presentan los últimos resultados de nuestra línea de investigación iniciada en 1976 en colaboración con P. Cossio, E. Segura, R. Laguens, R. Arana, N. Belomo, D. Alonso, R. Cardoni, M. T. Rimoldi, S. González Cappa, M. M. Elizalde de Bracco, L. Sterin Borda, H. Molina, G. Fernández Alonso, R. Pesce, E. Valero, G. Bortman, H. Grancelli y otros.¹⁹⁻⁴²

MATERIAL Y METODO

Se estudiaron 19 BEM y 3 AVI resecados quirúrgicamente en pacientes chagásicos crónicos.

Biopsias y aneurismas chagásicos: Para la obtención de las BEM se utilizó un catéter biótomo endocavitario de Shülze y Caves 9F USCI (Mass., USA) introduciéndolo en forma percutánea desde la vena yugular interna derecha bajo control fluoroscópico.¹⁰

Todos los pacientes firmaron consentimiento para realizar la BEM.

De cada intervención se obtuvieron tres a cuatro muestras que medían aproximadamente entre 1 y 2 mm. Las mismas fueron extraídas desde el ventrículo derecho, en su tercio inferior, pared libre y septum.

Fueron fijadas en formol buffer al 10%, luego incluidas en parafina y coloreadas finalmente con hematoxilina-eosina, tricrómico de Mallory,

técnicas para reticulina y fibras elásticas, y en algunos casos rojo Congo.

El diámetro medio de los miocitos se obtuvo utilizando las tinciones para retículo, tomando el menor diámetro por lo menos en veinte fibras cuya sección pasara por el núcleo utilizando una lente ocular micrométrica. La fracción de volumen de colágeno medio se determinó mediante la utilización de una grilla para conteo diferencial de puntos que consta de 484 cruces, obteniéndose el porcentaje entre las que cayeran en colágeno (coloreado de azul con tricrómico) y las que cayeran en fibras musculares (rojo con la misma técnica), descartando aquellas que correspondían a espacios libres debidos a artificios de la técnica.

Siguiendo la metodología propuesta por Olsen y colaboradores,⁴³ la calidad de las tomas se clasificó como: a) buenas: aquellas que poseían suficiente cantidad de tejido miocárdico con endocardio valorable; b) razonables: las que no presentaban endocardio; y c) pobres: las muy pequeñas, con muchos orificios o colgajos de miocardio o endocardio poco valorables mezclados con restos de coágulos.

Las alteraciones halladas fueron valoradas como (-) negativas, (+) leves, (++) moderadas y (+++) graves, para cada porción por separado (endocardio, miocardio e intersticio). También se buscó la presencia de arteriolas que midieran más de 200 micrones de diámetro externo y el hallazgo de fibrina y trombos.²⁸

Para realizar la técnica de inmunoperoxidasa, las muestras fueron previamente fijadas en formol buffer al 10%. Dicha técnica fue realizada con IgG, IgM, IgA⁴⁴ y C₃ mediante la inmunoglobulina Dako Kit PAP (Santa Bárbara, California). Para llevar a cabo el estudio de inmunofluorescencia se utilizaron técnicas clásicas ampliamente descriptas.⁵

Las biopsias fueron evaluadas de acuerdo con el análisis de Baandrup y Olsen.⁴³ Tres a cuatro muestras de 4 pacientes no chagásicos fueron utilizadas como controles y procesadas de la misma manera que las biopsias chagásicas (los controles pertenecían a pacientes que padecieron estenosis aórtica severa o miocardiopatía restrictiva). Por otra parte, el control de la técnica de inmunoperoxidasa fue realizado de la siguiente manera: las muestras fueron procesadas igual pero el antisuero específico fue cambiado por suero de cerdo normal y fueron como controles negativos tanto en los chagásicos como en los controles.¹⁰

Como controles positivos se utilizaron muestras de amígdalas humanas. El suero de cerdo

normal fue utilizado para eliminar las globulinas no específicas ligadas; y el peróxido de hidrógeno fue utilizado para bloquear la peroxidasa endógena.

Determinaciones del antígeno panleucocitario: Para identificar las células linfoides y los linfocitos T y B, las muestras, previamente fijadas en formalina y embebidas en parafina, fueron procesadas con el complejo avidina-biotina-peroxidasa y las técnicas inmunoenzimáticas extravidina-peroxidasa.⁴⁵

Se estudiaron los siguientes marcadores fenotípicos linfoides: antígeno común leucocitario, cadenas livianas kappa y lambda y antígeno linfocitario T activado. La técnica fue realizada de la siguiente manera:

1) Antígeno común leucocitario antihumano de ratón (ACL) (DAKO) 1:20, 4°C, toda la noche; IgG antirratón biotinilado, 30 minutos; a temperatura ambiente (TA), complejo avidina-biotina-peroxidasa preformado (Vector Labs) 30 minutos (TA).

2) Cadenas kappa o lambda de conejo anti-humanas (Biomarkor) 1:100, 60 minutos (TA); IgG sérica antirratón biotinilada 30 minutos (TA); extravidina-peroxidasa (Biomarkor) 30 minutos (TA).

3) Linfocitos T antihumanos de ratón (T-UCHL-DAKO) 1:20, 60 minutos; IgG sérica antirratón biotinilada 30 minutos (TA); extravidina-peroxidasa (Biomarkor) 30 minutos (TA).

Las reacciones fueron desarrolladas con 3,3' de diaminobenzidina más peróxido de hidrógeno y los cortes fueron contrateñidos⁴⁵ con hematoxilina. Se contó el número de células mononucleares positivas o negativas para cada marcador en tres campos de 400X. Estos números se correlacionaron con la extensión de la fibrosis intersticial y/o con el daño celular en cada muestra. De acuerdo con estudios previos⁴⁶ se consideró un número normal de linfocitos menor de 5,0 por campo de 400X.

Por otra parte, se tabuló el porcentaje de linfocitos en los infiltrados mononucleares, así como la concentración relativa de células con cadenas kappa y lambda (linfocitos B, expresados como el radio de uno sobre otro).

Para estudio ultraestructural, los tejidos fueron fijados en engltaraldehído buffer-fosfato al 3%, luego fijados en O₅O₄, deshidratados y embebidos en Polybed 812. Los cortes ultrafinos fueron teñidos con acetato de uranilo y citrato de plomo.¹⁸

Se estudiaron los aneurismas resecaos de ventrículo izquierdo pertenecientes a 3 pacien-

tes chagásicos que padecían episodios de taquicardia ventricular (TV), síncope o muerte súbita. Los pacientes habían sido estudiados por mapeos electrofisiológicos y las áreas en las cuales se desencadenaba la TV fue señalada por el cirujano entre puntos de sutura.

Las piezas quirúrgicas se fijaron y procesaron de la misma manera que las BEM. Para microscopía óptica se utilizó también la técnica de Barbeito López para detección de necrosis temprana.⁴⁷ Para microscopía electrónica, la técnica fue igual a la de las BEM.

También se procesaron secciones distantes a las rotuladas como arritmogénicas, para comparación entre ambas zonas. Desde el punto de vista histológico, las lesiones fueron subdivididas en: a) "daño miocárdico temprano" y b) "necrosis establecida".⁴⁷ El daño miocárdico temprano consistía en alteraciones citoplasmáticas focales en un miocito con cambios nucleares mínimos, representado esto como "parches amarillentos" dentro de una célula teñida de verde o azul con la técnica de Barbeito López. Con hematoxilina-eosina se manifestó como parches de homogeneización celular con una pérdida relativa de las estriaciones transversales o como un citoplasma granulado. Las fibras tenían un aspecto ondulado y presentaban hipereosinofilia.

La necrosis establecida se definió como un citoplasma completamente homogéneo con lisis nuclear progresiva, vistos directamente con hematoxilina-eosina. Con Barbeito López la necrosis establecida mostró color amarillo dorado en los citoplasmas.

La medición del espesor del endocardio, miocitos y porcentaje de fibrosis fue hecha en forma similar a la de las BEM.

Previamente se realizaron todos los estudios clínicos y con métodos complementarios cardiológicos no invasivos (Holter, ergometría, fonomecanocardiograma, ecocardiograma, radioisótopos con cámara gamma) a fin de descartar cualquier patología asociada (criterio para exclusión del estudio) y de correlacionar los hallazgos clínico-cardiológicos con las alteraciones detectadas por las biopsias endomiocárdicas.

RESULTADOS

Microscopía óptica

Las BEM mostraron leve a moderada hipertrofia de los miocitos. Los mismos medían entre 16 y 54 μm (considerando un valor normal de $11,6 \pm 1,7 \mu$ de diámetro para las fibras del ventrículo derecho.²⁸

Tabla 1
Datos clínicos, estudios complementarios y análisis de las biopsias endomiocárdicas

Nº	Sexo	Edad	Síntomas	ECG	Rx de tórax
19	M: 11	Rango: 28-61	Palpitaciones	Trastornos de conducción	Cardiomegalia VI
	F: 8	\bar{X} : 44	Disnea Precordialgia	BRD: 12 BRD+HBAI: 5 HBAI: 2	S/C: 2 1/3: 11 2/3: 6
<i>Fracción de eyección</i>			<i>Fracción de acortamiento</i>		
Rango: 27-58% - \bar{X} : 38,5%			Rango: 18-30% - \bar{X} : 25,9%		
<i>Diámetro de las fibras</i>		<i>Espesor del endocardio</i>		<i>Porcentaje de fibrosis</i>	
Rango: 12-34 μ m - \bar{X} : 24,5 μ m		Rango: 10-36 μ m - \bar{X} : 24,1 μ m		Rango: 5-39% - \bar{X} : 24,3%	

Se encontró también en algunos casos fibras con elongación, es decir, que presentaban núcleos grandes y diámetros proporcionalmente menores, implicando dilatación miocárdica (Figura 1). Otro hallazgo fue el desarreglo muscular consistente en pérdida del paralelismo de las fibras miocárdicas, con ángulos de entrecruzamiento variables, hasta 90° o convergiendo en diferentes direcciones.

Se observó también núcleos bizarros y halo perinuclear clásicamente descriptos como componentes de las hipertrofias miocárdicas.

No se encontraron amastigotes en ningún caso.

Hubo diferente grado de fibrosis intersticial (\bar{X} 27%) y se hallaron infiltrados linfocitarios

en 15 biopsias. Los endocardios se encontraban engrosados (\bar{X} 19,3 μ), debido a fibras colágenas.

En la Tabla 1 se detallan: fracción de eyección, fracción de acortamiento, clase funcional y demás datos clínicos de los 19 pacientes, el porcentaje de fibrosis de las BEM, así como el diámetro de las fibras miocárdicas y el espesor de los endocardios.

Macroscópicamente, los AVI tenían el aspecto de una pared groseramente disminuida de espesor y fibrosada. Los mismos medían 3 x 2, 5 x 3 y 3 x 2,5 cm respectivamente. El espesor osciló entre 2 y 4 mm. No se observaron nidos de amastigotes. Entre el pericardio y el endocardio aparecía miocardio con cantidad variable de fibrosis. El porcentaje de fibrosis intramiocár-

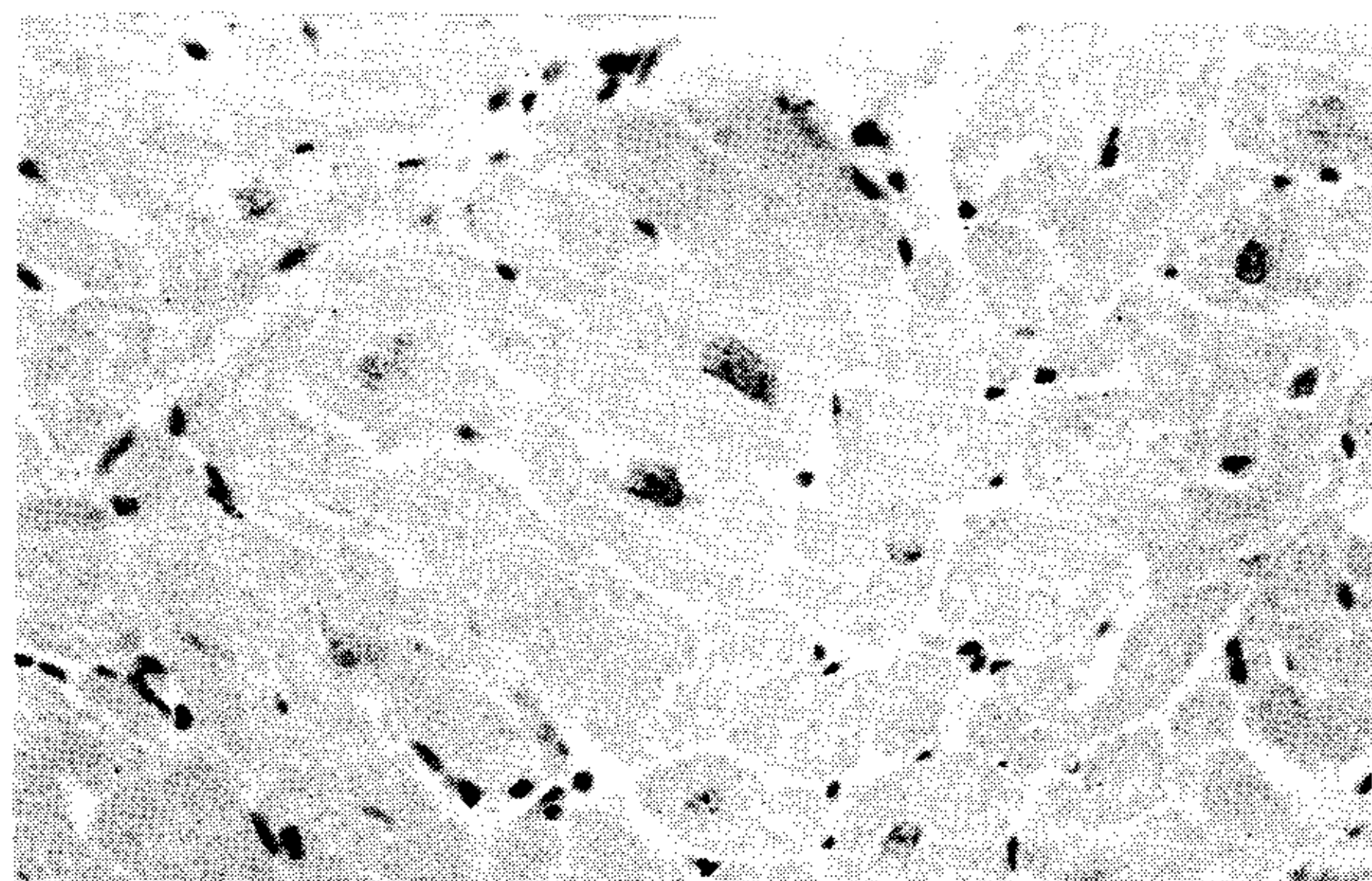


Fig. 1. MChCr. Biopsia endomiocárdica. Fibras con elongación, con núcleos grandes y diámetros proporcionalmente menores. Alternancia de fibras atróficas e hipertroficadas. H-E X400.

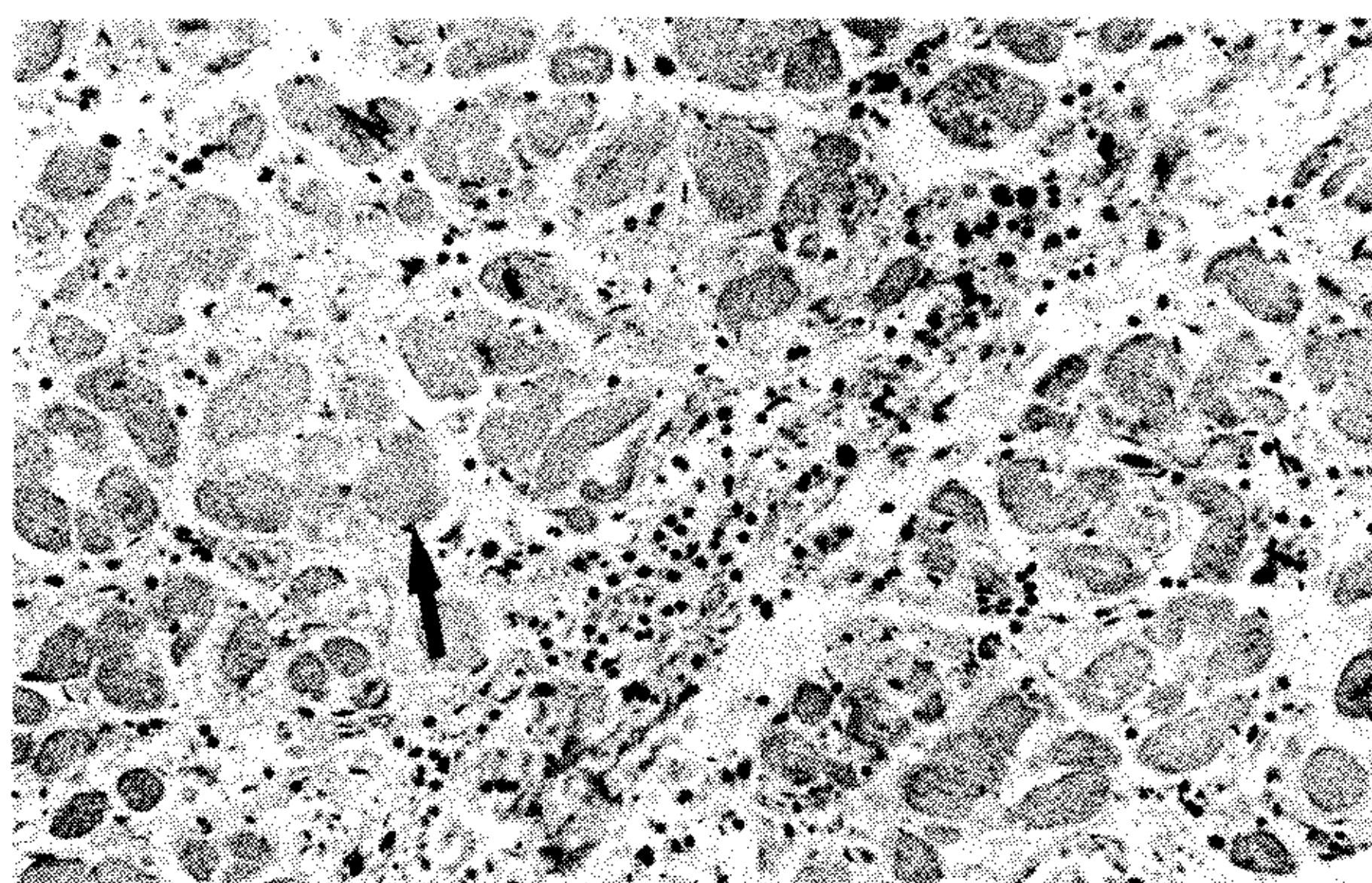


Fig. 2. MChCr. Biopsia endomiocárdica. Miocardio con reacción inflamatoria crónica y polinucleares dispersos. Daño miocárdico focal (flecha). H-E X250.

Tabla 2
 Datos morfométricos en tres aneurismas ventriculares izquierdos resecados por presentar arritmias intratables

Protocolo	Espesor del endocardio*	Diámetro fibras*	Diámetro haces miocárdicos*	% Fibrosis miocárdica	% Fibrosis miocárdica + endocardio
2408	357,4	29,1	257,1	65	92,7
2511	95,9	25,4	57,7	45,1	81,9
2571	170,9	45	246,7	48,1	90,7

*: Espesores y diámetros en μm .

dica fue de 65%, 45,1% y 48,1%, pero cuando se consideró el endocardio, los valores aumentaron a 92,7%, 81,9% y 90,7% respectivamente.

El endocardio se encontraba marcadamente engrosado: 357,4, 95,9 y 170,9 μm respectivamente. Las bandas de miocitos se encontraban rodeadas por fibrosis. El espesor de dichas bandas media desde 42 μm (pocos miocitos atroficos) hasta 457,8 μm (aproximadamente 12 células de diámetro). El diámetro de los miocitos osciló entre 4,5 μm y 56,6 μm .

El miocardio mostró reacción inflamatoria crónica y polinucleares dispersos (Figura 2). Existían miocitolisis y fibrosis extensas más comúnmente en el subendocardio. Se observó la presencia de "islotos" que consistían en miocitos necróticos, dañados o normales, rodeados por tejido fibroso. La técnica de Barbeito López fue muy útil en diagnosticar daño miocárdico temprano.⁴⁷ Este último predominó en las áreas marcadas por el cirujano como arritmogénicas.

Se asumió que estas fibras tenían caracterís-

ticas morfológicas anormales de alguna manera relacionadas con el daño miocárdico producido por la enfermedad de Chagas.^{10, 11} De hecho, las bandas engrosadas y finas mostraron necrosis establecida y capas de una a tres células de daño miocárdico temprano, separadas por gruesas hileras de miocitos aparentemente normales (Figura 3). Cuando fueron realizados cortes seriados, se demostró una clara continuidad entre grupos de fibras dañadas y normales.

En la Tabla 2 se detallan los datos morfométricos de los tres AVI resecados.

Estudios inmunohistoquímicos

Los resultados de la inmunofluorescencia se correlacionaron muy bien con los de la inmunoperoxidasa en todas las muestras de BEM estudiadas. Se observaron depósitos de IgG e IgA que daban coloración positiva en intersticio, capilares y endocardio, como un área brillante

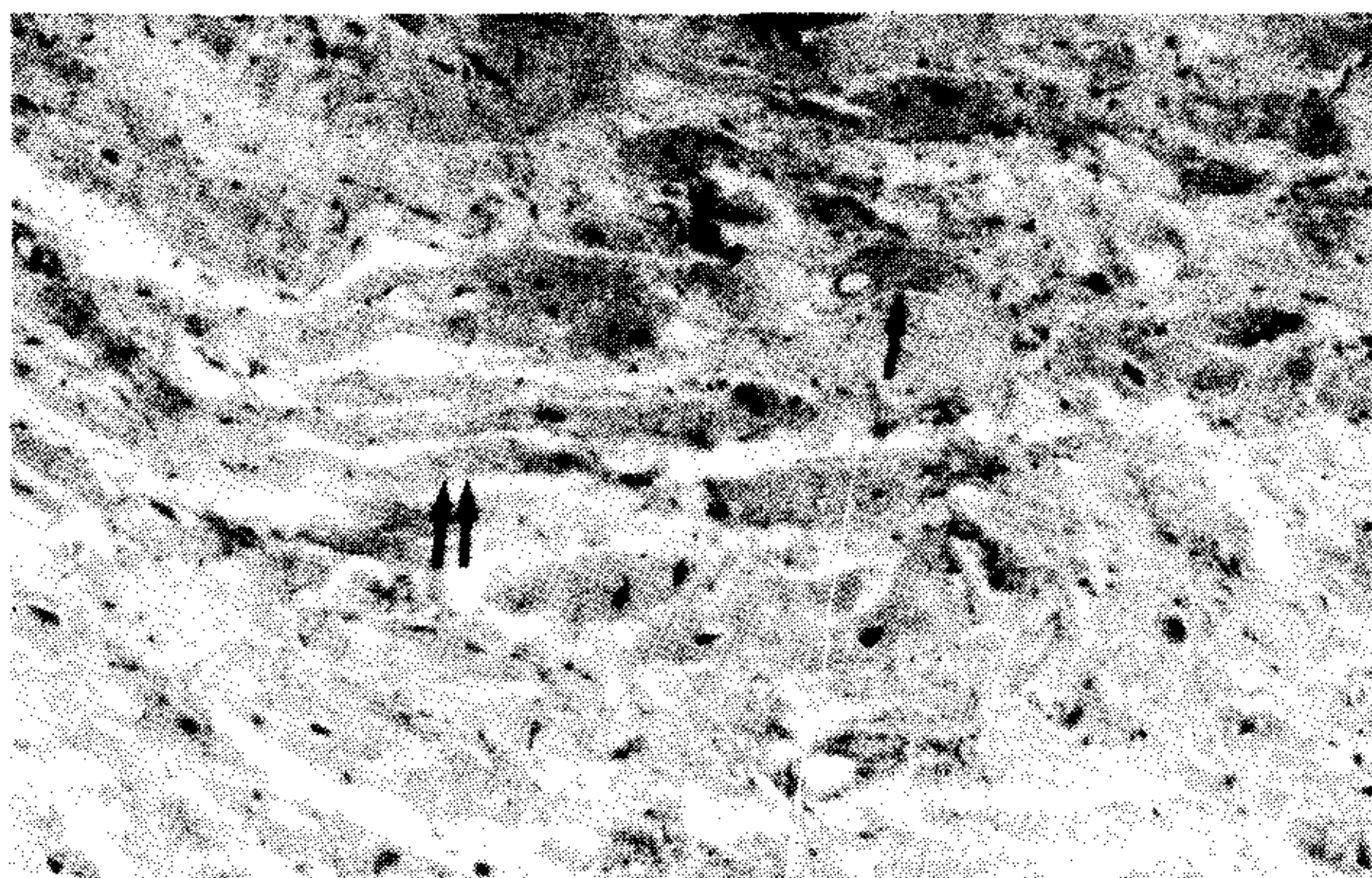


Fig. 3. Necrosis establecida (flecha) alternando con células con daño miocárdico temprano (flechas) separadas por hileras de miocitos aparentemente normales. Tricrómico de Barbeito-López X250.

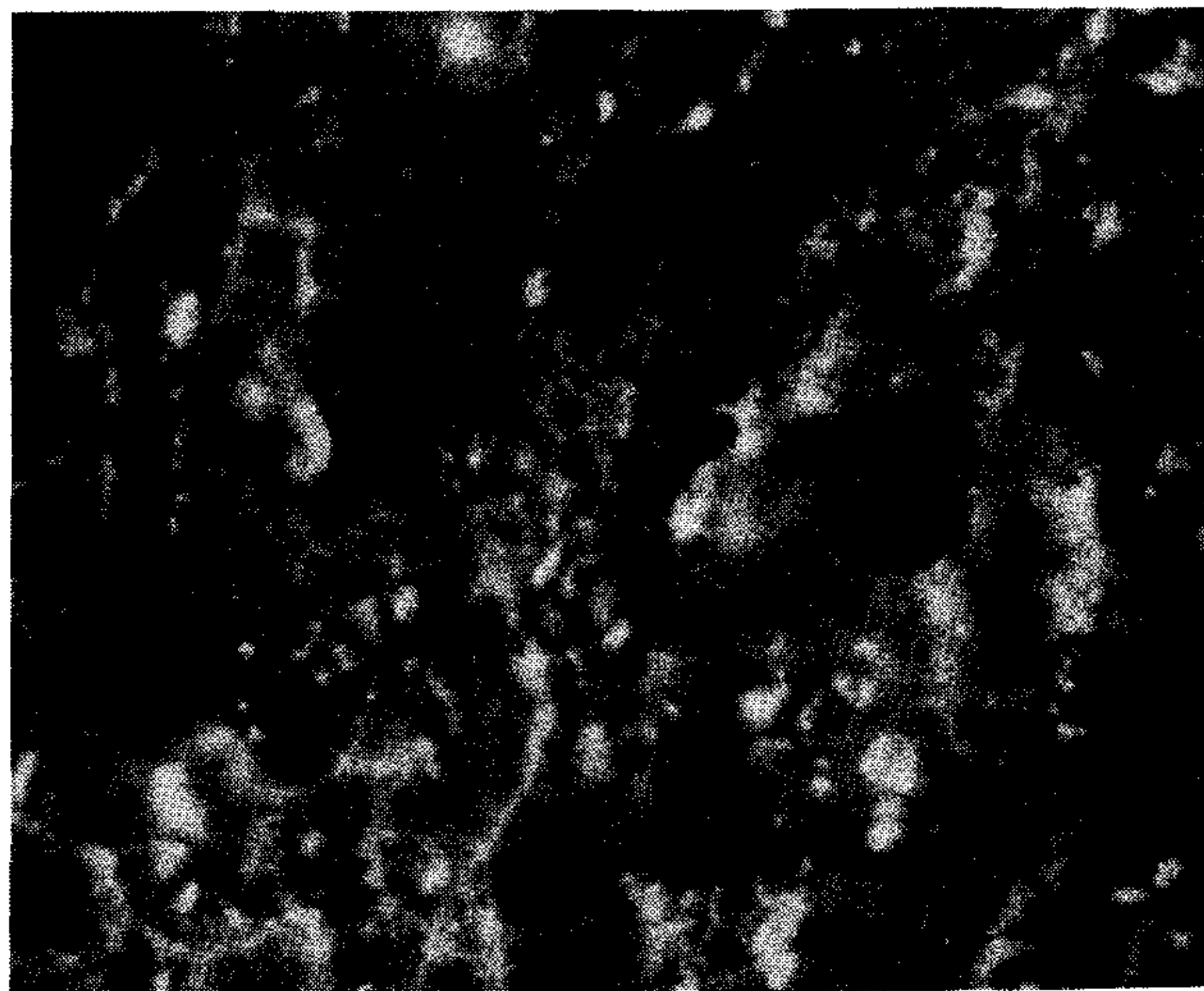


Fig. 4. Técnica de la inmunofluorescencia directa. Depósitos de IgG en forma de "parches" (flecha) sobre sarcolemas y paredes de los pequeños vasos. X400.¹⁰

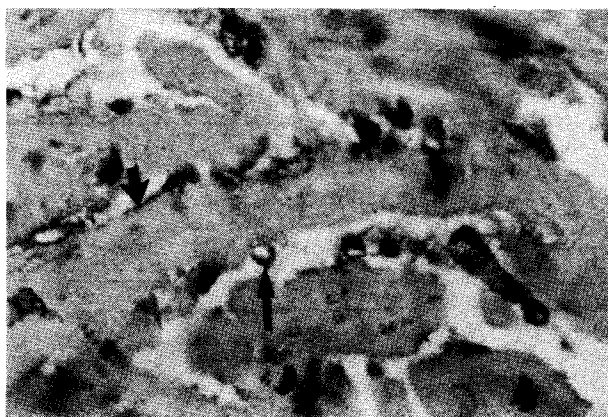


Fig. 5. Técnica de la inmunoperoxidasa en biopsia endomiocárdica. Depósitos de IgG sobre sarcolema de fibras miocárdicas (flechas cortas) y pared de capilares (flechas largas). X400.

alrededor de los mismos. Cuando la tinción fue positiva en las superficies de los miocitos, la misma adquirió la forma de "parches" (IgG, IgA y C₃) (Figura 4). En un paciente, la inmunofluorescencia reveló depósitos de IgA e IgG en capilares y sarcolema, no hallándose depósitos de C₃. La prueba de inmunofluorescencia indirecta frente al suero del mismo enfermo detectó la presencia de un antisuero anti-Igs, demostrándose una actividad autóloga con una localización intracelular.

En cuanto a las inmunoperoxidasas, se demostró IgG, IgA y C₃ en intersticio, endocardio, capilares y sarcolemas de miocitos, vistas al microscopio óptico como depósitos de sustancia marrón sobre la superficie de los mismos (Figura 5).

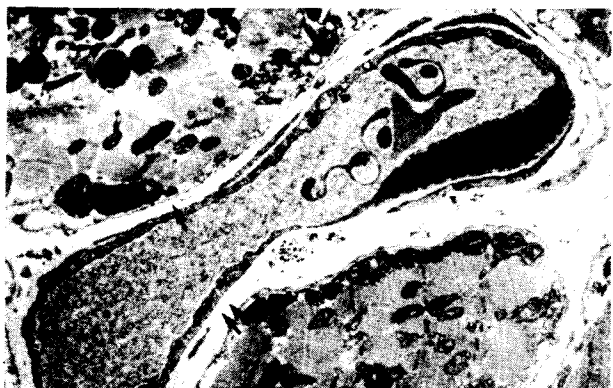


Fig. 7. MChCr. Microscopía electrónica. Capilar con marcado engrosamiento de la membrana basal (flechas), dos miocitos cortados transversalmente, con desorganización miofibrilar directa, mitocondrias con edema y engrosamiento de la membrana basal (flecha). X10.000.⁶⁵

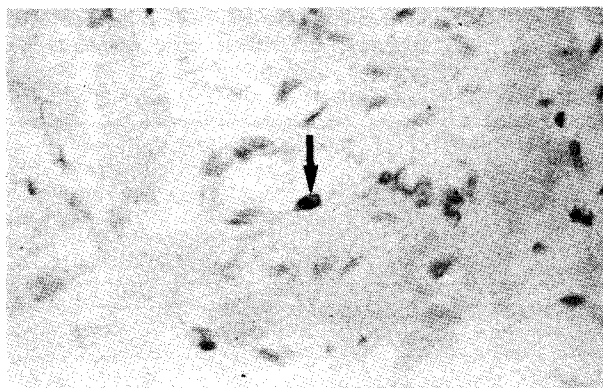


Fig. 6. Técnica de la biotina-extravidina para antígeno panleucocitario. Infiltrado con características citológicas compatibles con histiocitos (sin teñir) y escasa cantidad de linfocitos (teñidos de marrón) (flecha). X 250.

Los depósitos de IgM se observaron también en intersticio y en endocardio.

Panleucocitario. Biotina-extravidina

La relación linfocitos/mononucleares fue 1/18,5 x 400 (\bar{X} : 10/186 x 400). Se mantuvo la relación normal de los linfocitos B, es decir, cadenas kappa y lambda 3/1. El resto del infiltrado presentaba las características citológicas correspondientes a los histiocitos (Figura 6).

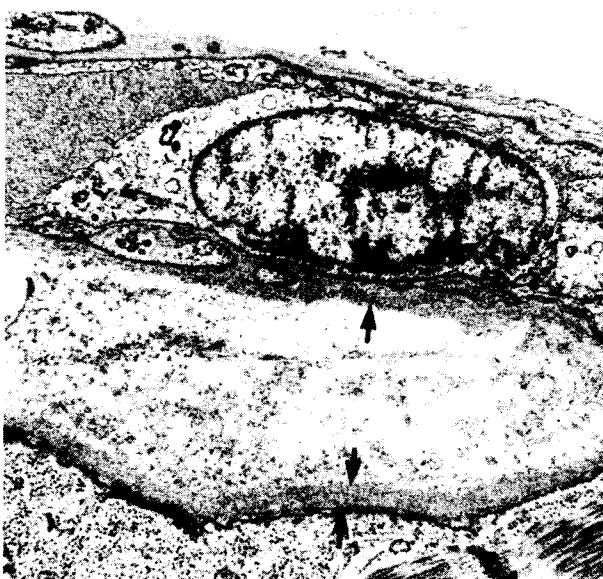


Fig. 8. MChCr. Microscopía electrónica. Superficie lateral de un miocito cardíaco con engrosamiento (4.000 Å) de la membrana basal (entre flechas). X32.000.¹⁸

Microscopía electrónica

Los miocitos mostraban pérdida parcial o completa de las miofibrillas, edema mitocondrial, disrupción de las crestas mitocondriales, acumulación de gránulos de lipofucsina, acumulación focal de partículas de glicógeno y áreas de edema intracelular (Figura 7). La alteración más llamativa fue el engrosamiento de la membrana basal de los miocitos, de las células endoteliales vasculares y de las células del músculo liso (Figura 8). Estos cambios se observaron tanto en los AVI como en las BEM.

El engrosamiento de las membranas basales fue homogéneo, sin subdivisiones entre lámina "clara" y "densa" y con una relativa baja densidad electrónica. A mayor aumento presentaba una apariencia fibrilar, midiendo alrededor de 1 micrón de espesor. Un material con características similares se halló en el sistema tubular transverso (tubos T), incluso formando masas irregulares en el intersticio. Las células endoteliales capilares y musculares lisas vasculares mostraban frecuentemente edema citoplasmático. En las áreas donde los miocitos y capilares tenían apariencia semejante a la normal, las membranas basales variaban entre 300 y 500 Å de espesor.

Estos últimos hallazgos¹⁸ muestran que las membranas basales de los capilares, células musculares lisas de los vasos y miocitos cardíacos de pacientes chagásicos crónicos se hallan marcadamente engrosadas, hasta 20 veces su tamaño normal de 500 Å.⁴⁸

DISCUSION

En este trabajo, si bien se confirman algunos de los hallazgos de la patología descritos clásicamente en la MChCr, se da a conocer una serie de observaciones ignoradas hasta el momento y que abren una nueva perspectiva en las líneas de investigación de la etapa crónica de la enfermedad.

Esto nos permite discutir a continuación las coincidencias con las descripciones habituales, para luego remarcar los nuevos aportes.

Coincidencias

Con respecto a la microscopía óptica, la MChCr mostró nuevamente la pléyade de hipertrofia-atrofia-degeneración de fibras miocárdicas, fibrosis variable hasta llegar a ser muy marcada, como en el caso de los AVI, y grosero engrosamiento endocárdico. Estas lesiones se vieron reflejadas también, como en otros trabajos,^{1,3} en las alteraciones inespecíficas observadas al microscopio electrónico: pérdida de

miofibrillas, edema celular variable y un amplio rango de alteraciones en las estructuras mitocondriales.^{7,8,49-52} No se encontraron seudocistitos formados por amastigotes.

Nuevos hallazgos aportados por este trabajo

Se utilizó por primera vez una técnica validada internacionalmente^{47,53-55} para "daño miocárdico temprano", con el fin de delinear probables circuitos de reentrada en AVI resecaados en pacientes portadores de arritmias intratables. En efecto, la presencia de haces miocárdicos, de 1 a 3 miocitos de espesor, mostrando daño miocárdico temprano (citoplasmas parcialmente amarillos con la técnica de Barbeito López), separados por gruesos haces de tejido aparentemente normal, configura el cuadro heterogéneo de entrelazamiento de tejido normal y levemente dañado, aunque viable, ideal para el establecimiento de un circuito de reentrada. Con microscopía electrónica pudimos corroborar este aserto, puesto que las zonas de células con discreto daño histológico mostraban sarcolemas intactos y núcleos de aspecto normal con cromatina bien dispersa.

Las alteraciones de estas fibras miocárdicas pueden explicarse por dos motivos: a) los fenómenos de autoinmunidad descritos en la etapa crónica⁵⁶ y b) el atrapamiento de los mismos por la intensa fibrosis existente. Justamente, como ha sido sugerido para la génesis de las arritmias malignas en aneurismas isquémicos,⁵⁷ éstas serían causadas por potenciales transmembrana anormales debido a cambios ultraestructurales por disposición anormal de los haces musculares englobados en el tejido fibroso o ambos.

Los haces musculares en las regiones subendocárdicas se encuentran separados por tejido conectivo denso. Si hubiera conexiones entre ellos, podrían formar circuitos de reentrada con un obstáculo anatómico. Estos circuitos subendocárdicos estarían probablemente conectados al subendocardio ventricular normal sólo a través de los bordes laterales del aneurisma. Los frentes interconectados de los miocitos sanos y con daño temprano (de conducción rápida y lenta respectivamente), juntos tendrían la configuración ideal de circuitos de reentrada, como fue demostrado en este estudio mediante cortes seriados. Las características morfológicas de los circuitos de reentrada fueron previamente analizadas por Fenoglio y colaboradores en un trabajo clásico⁵⁷ donde se comprueba la analogía, por lo menos desde el punto de vista de la correlación entre la electrofisiología y la patolo-

gía, en dos entidades aparentemente disímiles como son los aneurismas chagásicos y los isquémicos. Sin embargo, el tamaño exacto y el curso anatómico de los circuitos de reentrada no han sido aún bien definidos. Se calculó que podrían medir entre 2-3 cm⁵⁸ a 10-12 cm.⁵⁹ Pero la demostración directa de los circuitos anatómicos podría requerir demostrar diferencias de estructura entre el sitio de activación temprana durante la arritmia y otras áreas; indudablemente una dificultosa tarea, teniendo en cuenta el compromiso miocárdico difuso en la enfermedad de Chagas³ y las limitaciones en los métodos actualmente utilizados. La prueba final de que las arritmias se originaban en las regiones endocárdicas es su abolición por la resección del aneurisma. En nuestros casos, no pudimos observar recurrencias durante los tres años de seguimiento.

Otro de los aspectos salientes de nuestro estudio son los hallazgos vinculados con la ultraestructura del miocardio en la MChCr. El dato más notable fue el engrosamiento de la membrana basal en capilares miocárdicos, miocitos e intersticio.¹⁸

Dada su severidad, los cambios en las membranas basales en la miocardiopatía chagásica sí difieren claramente de aquellos observados en otras miocardiopatías. El engrosamiento, ya sea con o sin multilaminación, ha sido descrito en membranas basales de capilares miocárdicos en pacientes con diabetes sacarina, pero estos cambios no involucran las membranas basales de los miocitos.⁴⁸

Estas alteraciones han sido descritas también en pacientes con sarcoidosis miocárdica,^{60, 61} en el mixedema⁶² y en ratones con miocardiopatía genética asociada con diabetes sacarina (*KK mice*).⁶³ En todos estos casos las membranas basales afectadas tienden a formar láminas múltiples y concéntricas, las cuales individualmente serían algo más gruesas que las normales. Sin embargo, el engrosamiento de las membranas basales por material simple y homogéneo también ocurre en la diabetes sacarina y el mixedema.^{48, 62}

Ninguno de nuestros pacientes chagásicos crónicos presentaba alguna de estas dos enfermedades.¹⁸

El hallazgo del engrosamiento marcado de las membranas basales de los corazones de cada uno de los pacientes chagásicos crónicos con diversos grados de deterioro clínico sugeriría que no se trataría de una alteración inespecífica, con cambios tardíos causados por síntesis masiva de tejido conectivo, componente habitual

de los corazones con grado avanzado de fibrosis. Por el contrario, no se observaron engrosamientos similares en las membranas basales de corazones de pacientes con miocardiopatía dilatada idiopática y fibrosis miocárdica avanzada, si bien pequeños engrosamientos de las membranas basales han sido hallados en una minoría de pacientes con esta enfermedad.⁶¹ Por lo tanto, las alteraciones halladas en las membranas basales de miocitos y células endoteliales deberían servir como un marcador para distinguir la miocardiopatía idiopática dilatada de la MChCr por estudio ultraestructural de BEM. Es curioso que estos hallazgos del engrosamiento de las membranas basales no hayan sido descritos en estudios previos de microscopía electrónica.^{7, 64} Carrasco y colaboradores⁸ observaron recientemente depósitos de este material, el cual identificaron como glicoproteínas, en las luces de los túbulos T de los miocitos.

La naturaleza exacta de este material, responsable del engrosamiento de las membranas basales en la MChCr, permanece aún desconocida. Sería probable que este engrosamiento incluyera componentes de la membrana basal normal, colágeno y laminina, asociados a depósitos de inmunoglobulinas, más aún considerando la demostración en estudios previos^{6, 10} de estos depósitos inmunes y complemento en el intersticio miocárdico, vasos y miocitos de pacientes chagásicos crónicos. Debemos tener en cuenta una vez más los hallazgos de anticuerpos antilaminina en el suero de pacientes chagásicos crónicos, siendo la laminina una glicoproteína que forma parte de las membranas basales.¹² Se ha postulado que estos anticuerpos representan una respuesta inmunológica electiva a la presencia de una molécula similar a la laminina en la superficie del *T. cruzi*, como fue demostrado por el pasaje de estos anticuerpos absorbidos en columna de sefrosa.¹² Sin embargo, la relación entre la acumulación de este complejo material en las membranas basales y las anomalías inmunológicas debe ser aún definida. Una buena manera de demostrarlo sería mediante estudios inmunohistoquímicos con microscopía electrónica. Estos se han empezado a realizar por nuestro equipo para localizar los depósitos de inmunoglobulinas en el miocardio, dado que basados en los hallazgos efectuados hasta la actualidad sería difícil establecer con certeza si los depósitos de inmunoglobulinas, o bien sólo de antilaminina, corresponden en su distribución a los acúmulos de este "material" observados en las membranas basales.⁶⁵

En resumen, si bien la realización de las BEM

en la MChCr, así como la utilización de los métodos usados en este trabajo tanto en las BEM como en los AVI son investigaciones académicas y no deben ser consideradas como un estudio de rutina, su utilización en la investigación de la patogenia de la miocardiopatía chagásica es indudable y los últimos hallazgos así lo demuestran.⁶⁵

Si el llamado anticuerpo antilaminina tiene un rol fisiopatogénico o no (impidiendo por ejemplo la adecuada nutrición de los miocitos), o si su dosaje en suero puede llegar a ser un marcador útil en la enfermedad, o si tiene o no valor pronóstico, o si su depósito interfiere en la composición del glicocálix de la cubierta externa sarcolemal, generando o favoreciendo las arritmias intratables de la MChCr, queda para ser contestado en investigaciones futuras.

BIBLIOGRAFIA

1. Amorim DS: Chagas' disease. *Progr Cardiol* 8: 235-279, 1977.
2. Editorial: New light on Chagas' disease. *Lancet* 1: 1150, 1965.
3. Andrade ZA, Andrade SG: Patología. In: Brener Z, Andrade Z (eds): *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. Editora Guanabara Koogan SA, Río de Janeiro, 1979, pp 199-248.
4. Santos Buch CA: American trypanosomiasis (Chagas' disease). *Int Rev Exp Pathol* 19: 63-100, 1979.
5. Cossio PM, Diez C, Szarfman A, Kreutzer E, Candiolo B, Arana RM: Chagasic cardiopathy. Demonstration of a serum gamma-globulin factor which reacts with endocardium and vascular structures. *Circulation* 49: 13, 1974.
6. Laguens RP, Cossio PM, Diez C, Segal A, Vázquez C, Kreutzer E, Khoury E, Arana RM: Immunopathologic and morphologic studies of skeletal muscle in Chagas' disease. *Am J Pathol* 80: 153-162, 1975.
7. Palacios E, Carrasco H, Scorza C, Espinosa R: Ultraestructura miocárdica en la enfermedad de Chagas. Diagnóstico diferencial con las miocardiopatías dilatadas o congestivas y con las miocardiopatías arrítmicas. *Rev Latin Cardiol* 3: 115-137, 1982.
8. Carrasco Guerra HA, Palacios-Pru E, Dagert de Scorza C, Molina C, Inglessi G, Mendoza RV: Clinical, histochemical and ultrastructural correlation in septal endomyocardial biopsies from chronic chagasic patients: detected of early myocardial damage. *Am Heart J* 113: 716-724, 1987.
9. Tafuri WL, Maria TA, López ER, Chapadeiro E: Microscopia electrónica do miocárdio na tripanosomiase cruzi humana. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 15: 347-370, 1973.
10. Molina HA, Milei J, Storino R: Chronic Chagas' myocardio-pathy. Demonstration of in vivo bound immunoglobulins in heart structures by the immunoperoxidase technique. *Cardiology* 71: 297-306, 1984.
11. Storino R, Milei J: Miocardiopatía chagásica crónica. Un enfoque para el clínico general. Club de Estudio, Buenos Aires, 1986, pp 90-101.
12. Szarfman A, Terranova VP, Rennard SI, Foidart JM, De Fatima Lima M, Scheinman JL, Martín GR: Antibodies to laminin in Chagas' disease. *J Exp Med* 155: 1161-1171, 1982.
13. Milei J, Storino RA: Laminin in chagasic autoimmunity? *Parasitol Today* 3: 119-120, 1987.
14. Carrasco H: Comunicación personal, octubre 1986.
15. Avila JL, Rojas M, Velázquez-Avila G, von der Mark H, Timpl R: Antibodies to basement membrane protein nidogen in Chagas' disease and American cutaneous leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 24: 775, 1986.
16. Towin H, Rosenfelder G, Wieslander J, Avila JL, Rojas M, Szarfman A, Esser K, Nowak K, Timpl R: Circulating antibodies to mouse laminin in Chagas' disease, American cutaneous leishmaniasis, and normal galactosyl (α 1-3) galactosa epitopes. *J Exp Med* 166: 419-432, 1987.
17. Molina H, Kierszenbaum F: Acumulación y activación de eosinófilos en miocarditis chagásica. *Rev Arg Cardiol* 55: 134, 1987.
18. Ferrans VJ, Milei J, Tomita Y, Storino RA: Basement membrane, thickening in cardiac myocytes and capillaries in chronic Chagas' disease. *Am J Cardiol* 61: 1137-1140, 1988.
19. Bolomo N, Milei J, Segura E, González Cappa E, Cossio P, Arana A: Infección chagásica experimental en un primate sudamericano (*Cebus* sp). *Medicina (Bs As)* 37: 509, 1978.
20. Bolomo N, Del Prado C, Nagle C, Milei J, Arana R, Segura E: Encuesta clínica, parasitológica, serológica y electrocardiográfica de la enfermedad de Chagas-Mazza en una colonia de *Cebus* sp, primate no humano del Nuevo Mundo. V Reunión Anual de Enfermedad de Chagas. Rosario, junio 1979.
21. Bolomo NJ, Milei J, Arana R, Segura E, Cossio PM: Experimental Chagas' disease in a South American non-human primate. *Medicina (Bs As)* 40: 667, 1980.
22. Bolomo N, Milei J, Cossio P, Nagle C, Arana R, del Prado CE, Segura E: Infección crónica por *Trypanosoma cruzi* en el *Cebus* sp adulto. *Medicina (Bs As)* 41: 668, 1981.
23. Milei J, Bolomo NJ, Vázquez A, Nagle C: Normal and pathological electrocardiographic patterns in the *Cebus* monkey. *J Medical Primatology* 11: 10, 1982.
24. Storino RA, Milei J, Molina HA: Miocardiopatía chagásica crónica; estudio inmunológico en 38 casos e inmunohistoquímica de biopsias endomiocárdicas en 5 casos. XX Congr Arg Patología, Buenos Aires, noviembre 1983.
25. Storino RA, Milei J, Molina H: La miocardiopatía chagásica crónica y su correlación con el anticuerpo EVI. XIX Congr Cardiol Arg, Tucumán, 1983.
26. Cossio PM, Basombrio MA, Bolomo N, Milei J, Arana RM: Estudios inmunológicos y morfológicos en la enfermedad de Chagas experimental del ratón. *Medicina (Bs As)* 43: 517, 1983.
27. Cardoni R, Rimoldi MT, Esteva M, Milei J: Factores genéticos involucrados en la respuesta inmune de ratones infectados con *T. cruzi*. II Reunión Nac Invest Enfermedad de Chagas. Buenos Aires, 1983.
28. Molina HA, Milei J, Storino RA, Belardi J, Fernández Aramburu D: Biopsias endomiocárdicas. Metodología semicuantitativa y morfométrica. Correlación anatomoclínica. *Rev Arg Cardiol* 57: 207, 1984.
29. Molina HA, Rimoldi MT, Milei J, Sica REP, de Souza Andrade LR, Masciotra L: Immunohistochemical studies in Chagas disease. XI Reunión Anual de Pesquisa Básica em Doença de Chagas. Caxambu, Brazil, 1984.
30. Milei J, Bolomo N, Basombrio M, Cossio P: Correlación electrocardiográfica-anatomopatológica en la miocardiopatía chagásica crónica del ratón. *Medicina (Bs As)* 44: 483-488, 1985.
31. Milei J, Storino RA: Los modelos experimentales en la miocardiopatía chagásica crónica. *Corde* 2: 23, 1985.
32. Molina H, Milei J, Rimoldi MT, Cardoni R, González Cappa SM: Histopatología del sistema excitoconductor de ratones crónicamente infectados con *T. cruzi*. XIX Congr Arg Cardiol. Buenos Aires, 1985.
33. Molina H, Milei J, Rimoldi M, Cardoni R, González Cappa S: Lesiones en el sistema de conducción del ratón con infección chagásica crónica. *Medicina (Bs As)* 45: 417, 1985.
34. Storino RA, Milei J, Bellver E, Ferreira R, Ruiz Calderón N: Aneurismas ventriculares en la miocardiopatía chagásica crónica. Hallazgos clínicos y diagnóstico no invasivo. *Medicina (Bs As)* 45: 417, 1985.

35. Milei J, Molina HA, Storino RA: Histología y hallazgos inmunopatológicos en el haz de conducción y miocardio contráctil del ratón crónicamente infectado con *T. cruzi*. VIII reunión de Investigadores de Enfermedad de Chagas. Secretaría de Ciencia y Técnica. Río Hondo. Santiago del Estero, 1-2 mayo, 1986.
36. Storino RA, Milei J, Mann J: Non-invasive assessment of left ventricular involvement in latent chronic Chagas cardiomyopathy. 10th World Congress of Cardiology. Washington DC, September 14-21, 1986.
37. Bellver E, Storino RA, Milei J, Ferreyra R, Mann J: Ventricular aneurysms in chronic Chagas cardiomyopathy assessment by non-invasive methods. 10th World Congress of Cardiology. Washington DC, September 14-21, 1986.
38. Cardoni RL, Rimoldi MT, Esteva M, Milei J: Heart damage in inbred strains of mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. *Medicina (Bs As)* 47: 493-499, 1987.
39. Molina HA, Milei J, Rimoldi MT, González Cappa SM, Storino RA: Histopathology of the conducting system in experimental Chagas' disease in mice. *Trans Royal Trop Med & Hyg* 82: 241-246, 1988.
40. Milei J, Scordo D, Basombrio MA, Beigelman RL, Storino RA: Myocardial involvement in *cavia porcellus* infected with *Trypanosoma curzi*. *Medicina (Bs As)*, 1988 (in press).
41. Beigelman R, Pesce R, Valero E, Muratore C, Falasca C, Storino RA, Milei J: Ultraestructura de aneurismas chagásicos arritmogénicos: su relación con taquicardias y fibrilaciones ventriculares. Congreso Cardiología '88, Buenos Aires, 1988.
42. Bortman G, Beigelman R, Grancelli H, Fernández Alonso G, Carli A, Milei J: Antígeno panleucocitario en biopsias endomiocárdicas de pacientes chagásicos. Congreso Cardiología '88, Buenos Aires, 1988.
43. Baandrup V, Ilsen EGJ: Critical analysis of endomyocardial biopsies from patients suspected of having cardiomyopathy. I: Morphological and morphometric aspects. *Br Heart J* 45: 475, 1981.
44. Sternberger LA: *Immunocytochemistry* (2nd ed). Wiley, New York, 1979.
45. Guedon JL, Ternynck T, Anameas S: The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. *J Histochem Cytochem* 27: 1131, 1979.
46. Edwards WD, Holmes DR, Reeder GS: Diagnosis of active lymphocytic myocarditis by endomyocardial biopsy. Quantitative criteria for light microscopy. *Mayo Clin Proc* 57: 4129, 1982.
47. Milei J, Storino R: Early myocardial infarction. A feasible histologic diagnostic procedure. *Jpn Heart J* 27: 307, 1986.
48. Silver MD, Huckell VF, Lorber M: Basement membranes of small cardiac vessels in patients with diabetes and myxedema: preliminary observations. *Pathology* 7: 213-220, 1977.
49. Pereira-Barreto AC, Mady C, Arteaga-Fernández E, Stolf N, López EA, Higuchi MD, Belloti G, Pileggi F: Right ventricular endomyocardial biopsy in chronic Chagas' disease. *Am Heart J* 111: 307-312, 1986.
50. Mac Clure E, Poche R: Die experimentelle Chagas-Myocarditis der weissen Maus im elektronenmikroskopischen Bild. *Virchows Arch Pathol Anat* 333: 405-420, 1960.
51. López ER, Tafuri WL, Chapadeiro E, Lauria Pires L, Macedo V, Prata AR, Tanus R: Doença de Chagas em cães. Estudo anatomopatológico de animais naturalmente infectados. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 22: 135-143, 1980.
52. Sanabria A, Aristimuño J: Estudio ultramicroscópico de la miocarditis chagásica crónica en el ratón. *Acta Cient Venezol* 23: 66-74, 1972.
53. Milei J, Bolomo N: A routine method for diagnosis of early myocardial infarction. *Int J Cardiol* 4: 319, 1983.
54. Milei J, Boveris A, Llesuy S et al: Amelioration of adriamycin-induced cardiotoxicity in rabbits by prenylamine and vitamins A and E. *Am Heart J* 111: 95, 1986.
55. Ferreira R, Llesuy S, Milei J, Scordo D, Boveris A: Assessment of oxidative stress in patients submitted to myocardial revascularization. *Am Heart J* 115: 307-312, 1988.
56. Cossio PM, Casanova MB, Bellido C, Arce L, Storino R, De La Vega M, Diez C, Arana RM: Autoimmune response against myocardial tissue in Chagas' disease. *Medicina (Bs As)* 45: 643, 1985.
57. Fenoglio JJ Jr, Pham TD, Harken AH, Horowitz L, Josephson ME, Wit A: Recurrent sustained ventricular tachycardia: Structure and ultrastructure of subendocardial regions in which tachycardia originates. *Circulation* 68: 518-533, 1983.
58. Josephson ME, Horowitz LN, Farshidi A: Continuous local electrical activity: a mechanism of recurrent ventricular tachycardia. *Circulation* 57: 659, 1978.
59. Horowitz LN, Josephson ME, Harken AH: Epicardial and endocardial activation during sustained ventricular tachycardia in man. *Circulation* 61: 12227, 1980.
60. Mikami R, Sekiguchi M, Ryuzin Y, Kobayashi F, Hiraga Y, Shimada Y, Mochizuki I, Kobayashi T, Tamura S, Hosoda Y: Changes in the peripheral vasculature of various organs in patients with sarcoidosis. Possible role of microangiopathy. *Heart Vessels* 2: 129-139, 1986.
61. Sekiguchi M, Nagao H, Kaneko M, Hiroe M, Hirosawa K, Yamane K, Matsui Y, Iwai K: Detection of basal lamina layering in the capillaries in the heart muscle in cases with sarcoidosis. *Sarcoidosis* 2: 65, 1985.
62. McFadden PM, Berenson GS: Basement membrane changes in myocardial and skeletal muscle capillaries in myxedema. *Circulation* 45: 808-814, 1972.
63. Tomita Y: A histopathological study on the myocardial lesions in KK mice. With special reference to its causative factors and prevention of deteriorating the disease condition. *J Nippon Med School* 51: 601-614, 1984.
64. Figueiredo F, Marin-Neto JA, Rossi MA: The evaluation of experimental *T. cruzi* cardiomyopathy in rabbits: further parasitological, morphological and functional studies. *Int J Cardiol* 10: 277-290, 1986.
65. Milei J, Storino RA: El anticuerpo antilaminina en el cono-cimiento de la patogenia de la miocardiopatía chagásica crónica. *Rev Fed Arg Card*, 1988 (en prensa).