

Artículo original

Apoptosis y endotelio vascular en un modelo experimental de endocarditis

Miguel Ambrosio Domínguez-Hernández,¹ Iván Isidro Hernández Cañaveral,¹ Sergio Sánchez Enríquez,² Mercedes González Hita, Juan Ramón Galindo Barajas,¹ Jean Baptiste Michel³

¹ Departamento de Microbiología y Patología. Centro Universitario de Ciencias de la Salud. Universidad de Guadalajara.

² Departamento de Biología Molecular y Genómica. Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara.

³ INSERM 698, Remodelaje Cardiovascular, Universidad de París, Centre Hospitaliere Universitaire Xavier Bichar, 75018 Paris.

Resumen

Antecedentes: La fisiopatología de la endocarditis infecciosa implica la interacción tisular huésped-patógeno, resultando en la formación de vegetaciones tromboticas relacionadas con la activación plaquetaria inducida por bacterias. Los residuos de fosfatidilserina son expuestos por bacterias, células apoptóticas y células inflamatorias. En virtud de que las vegetaciones son coágulos constituidos de fibrina y plaquetas, en los cuales existe una actividad procoagulante incrementada por la colonización bacteriana, nosotros investigamos las características histológicas y la presencia de apoptosis en las vegetaciones mediante la utilización de un modelo de endocarditis infecciosa en ratas. **Métodos y resultados:** La endocarditis trombotica no bacteriana y séptica se indujeron introduciendo un catéter de polietileno a través de la válvula aórtica en ratas. Las ratas se inyectaron ya sea con un inóculo bacteriano (*S. aureus*) o con solución salina. El análisis histológico del tejido miocárdico adyacente a las vegetaciones demostró apoptosis y degeneración mucoide sin degradación de la matriz extracelular. **Conclusiones:** El modelo de endocarditis experimental presentado puede ser utilizado para el estudio de la apoptosis, los mecanismos de daño endotelial y de la degradación de la matriz extracelular inducidos por microorganismos.

Palabras clave: *Apoptosis, endocarditis.*

Summary

Background: The pathophysiology of infective endocarditis involves a pathogen / host tissue interaction, leading to formation of thrombotic vegetations, related to bacteria-induced platelet activation. Phosphatidylserines residues are exposed by activated platelets, apoptotic and inflammatory cells. Since vegetations are platelet-fibrin clots in which platelet proaggregant activity is enhanced by bacterial col-

onization, we investigated the histological characteristics and apoptosis in vegetations using a model of infective endocarditis in rats. **Methods and results:** Nonbacterial and septic thrombotic endocarditis was induced in rats using a polyethylene catheter left indwelling through the aortic. The rats were injected with either a bacterial inoculum (*Staphylococcus aureus*) or saline. Histological analysis of myocardial tissue underlying the vegetations showed myocyte apoptosis and mucoid degeneration, without extracellular matrix degradation. **Conclusions:** The endocarditis experimental model presented can be used to study apoptosis, the endothelial injury process and the extracellular matrix degradation induced by germs.

Key words: *Apoptosis, endocarditis.*

Introducción

La endocarditis infecciosa (EI) constituye un reto diagnóstico y terapéutico en cardiología e infectología, el cual es evidenciado por su incidencia y morbimortalidad intrahospitalaria.^{1,2} Además del daño mecánico causado por las vegetaciones fibrinoides endocárdicas, que es la principal lesión de la endocarditis, las complicaciones más frecuentes de esta patología son las alteraciones a nivel pulmonar (EI de cavidad derecha) y a nivel sistémico (EI de cavidad izquierda).³ La vegetación fibrinoide constituye un modelo específico de interacciones huésped-patógeno, que implica la formación de un trombo séptico además del daño valvular al miocardio y a la posible diseminación del trombo.⁴ Desde 1972,⁵ el modelo experimental de endocarditis se ha desarrollado asociando el daño al endotelio vascular mediante la introducción de un catéter y la formación de un trombo no bacteriano (estéril), el cual es posteriormente colonizado por una bacteriemia transitoria, provocada mediante la inyección de gérmenes en la periferia. El crecimiento de la vegetación está relacionado a la formación del trombo séptico, al depósito

del complejo fibrina-fibronectina,⁶ así como a la activación y la agregación plaquetaria. La activación plaquetaria es acompañada de la exposición de residuos de fosfatidilserina, no sólo en la superficie de las plaquetas activadas,^{7,8} sino también en las células apoptóticas.⁹

La apoptosis es uno de los mecanismos de muerte celular y un acontecimiento necesario para la remodelación tisular y de la matriz extracelular. En un estudio reciente, Rouzet y cols. demostraron que la anexina V radiomarcada con Tecnecio⁹⁹ tiene la capacidad de proveer una imagen funcional de las vegetaciones fibrinoides en varios modelos de endocarditis (artículo en proceso de publicación).¹⁰ La anexina V constituye un ligando específico de la fosfatidilserina, la cual es expuesta en la superficie de las plaquetas y de las células apoptóticas.

En virtud de que las vegetaciones endocárdicas sépticas poseen una actividad plaquetaria importante con la consecuente exposición de residuos de fosfatidilserina, en este estudio nosotros investigamos la presencia de apoptosis y estudiamos la histología de la vegetación, en un modelo de endocarditis en la rata provocada mediante una cepa de estafilococo aureus (*S. aureus*).

Material y métodos

Modelo experimental

Se utilizaron ratas Wistar macho con un peso promedio de 350 gramos. La endocarditis infecciosa de la válvula aórtica y del ventrículo izquierdo se provocó de acuerdo al método de Durack⁵ y cols. modificado por B. Fantin.¹¹ El procedimiento consistió en la colocación de un catéter de polietileno (P.E. 50 Clay Adams), el cual fue conectado a un manómetro e insertado en el ventrículo izquierdo a través de la arteria carótida derecha, estando los animales bajo anestesia con ketamina-xilazina. La colocación del catéter fue monitorizada midiendo la presión intraventricular izquierda. Posteriormente, el catéter se fijó a la arteria carótida y permaneció en su posición durante todo el experimento. Después de 72 horas del cateterismo y la recuperación de la anestesia, 7 ratas se inocularon con una cepa de *S. aureus* en la vena yugular izquierda. El otro grupo de 7 ratas no se inoculó y sirvió como grupo control (vegetaciones estériles).

Histología e inmunohistoquímica

Las vegetaciones endocárdicas de la válvula aórtica, válvula mitral o miocardio se fijaron en formol amortiguado al 10% durante 24 h y luego se procesaron para hacer cortes en parafina de 4µ de espesor y realizar las tinciones de H&E, azul alciano acoplada con rojo nuclear para la identificación de células y núcleos, y la acumulación de mucopolisacáridos, respectivamente. Para localizar las células apoptóticas

se utilizó la técnica de TUNEL (*del inglés* Terminal transferasa-mediated dUTP nick end-labeling),¹² la cual permite observar el DNA fraccionado sobre cortes fijados con formol, de acuerdo al proveedor (ROCHE). Se utilizó como control positivo la enzima DNAasa I (Qbiogene) y un control negativo en el cual se omitió la utilización de la transferasa terminal. El núcleo de las células se observó mediante una contracoloración con el cromógeno DAPI (4', 6' hidrocloreuro de -diamino-2-fenilidol).

Resultados

De las 14 ratas operadas, 4 fallecieron en el transoperatorio por problemas anestésicos. Al momento de la disección y posterior a ser eutanizadas, los dos grupos de ratas tuvieron el catéter en el ventrículo izquierdo y desarrollaron vegetaciones fibrinoides. El examen macroscópico al momento de sacrificarlas demostró que las vegetaciones se localizaron principalmente en la válvula aórtica, sin embargo, también se observaron en el catéter y en el ventrículo.

Morfología microscópica de las vegetaciones

Microscópicamente, las válvulas aórticas de las ratas operadas presentaron un aspecto normal (dato no mostrado). La cateterización crónica sin inoculación microbiana provocó el desarrollo de trombos pequeños a nivel de la válvula aórtica. Por el contrario, en las vegetaciones aórticas sépticas se observó un trombo bien definido, el cual proliferó sobre las válvulas y a todo lo largo del catéter (figura 1). Histológicamente, las vegetaciones tuvieron el



Figura 1. Vegetación séptica. Se observa un grupo de trombos bien definidos en la superficie de la válvula aórtica. (x400).

aspecto usual de un coágulo constituido por fibrina y plaquetas (figura 2), y una importante acumulación de eritrocitos y glóbulos blancos. Un aspecto interesante e innovador se observó con la coloración de azul alciano, el cual reveló áreas mucoides en el tejido miocárdico, aórtico y valvular, en estrecho contacto con las vegetaciones. Mediante la coloración diferenciada con rojo nuclear se pudo observar que estas áreas mucoides están desprovistas de componentes celulares. Estas áreas constituyeron el sitio de positividad con técnica de TUNEL, lo cual sugiere que la desaparición de las células mesenquimatosas está ligada topográficamente a la actividad enzimática o proteolítica de la vegetación.

Discusión

Con base en lo propuesto por diferentes autores⁴ y confirmado en el presente estudio, la endocarditis trombótica séptica y estéril demuestran consecuencias patológicas comunes, principalmente ligadas a las actividades proteolítica y procoagulante, ocasionadas por la formación y degradación del trombo, amplificadas por la colonización bacteriana.¹³

El modelo de endocarditis que se presenta en este estudio es fácil de realizar, es de bajo costo y permite la utilización de una cantidad importante de ratas para la experimentación farmacológica. No obstante, el modelo en ratas presenta ciertas limitaciones. Por ejemplo, en la rata el gen que codifica para la IL-8 no está presente¹⁴ lo cual lleva a un daño tisular limitado en respuesta a una inoculación local de bacterias.¹⁵

La técnica de azul alciano permitió visualizar ciertas áreas desprovistas de células y reemplazadas por una dege-

neración mucoide. Esta degeneración mucoide de los glucosaminoglicanos usualmente ha sido descrita en patologías vasculares como los aneurismas y la disección de la aorta ascendente.¹⁶ Estos sitios de degeneración mucoide siempre correspondieron a áreas donde predominó la apoptosis que se evidenció mediante la técnica de TUNEL, demostrado por áreas de desaparición de miocitos. Este material mucoide basofílico corresponde a la acumulación de glucosaminoglicanos modificados, usualmente descrito en otras patologías vasculares no infecciosas como los aneurismas y las disecciones de la aorta ascendente.¹⁷ En estos casos, la degeneración mucoide parece estar ligada a la desaparición de células musculares y a la degradación de la matriz extracelular. En el presente estudio se observó de manera constante tal fenómeno de desaparición celular y de retención mucoide en los tejidos (aorta y miocardio) en áreas subyacentes a las vegetaciones. Por el contrario y posiblemente por el corto periodo de observación (3-5 días), no se observó una evidencia gruesa de degradación de la matriz en estas áreas, lo cual sugiere que la desaparición de células y la retención de glucosaminoglicanos preceden a la degradación de la matriz. En la endocarditis, esta observación puede estar relacionada a la capacidad de ciertas proteasas, liberadas por la vegetación séptica, para inducir la liberación y muerte de los miocitos.¹⁸ Las cepas de estreptococo y de estafilococo aportan activadores del plasminógeno como la estreptocinasa y la estafilocinasa, lo cual lleva a la generación de plasmina, que en su momento activan las proteasas del huésped.¹⁹ Por otra parte, la apoptosis de las células endoteliales inducida por la alfa toxina ha sido bien documentada con cepas invasivas de *S. aureus*,²⁰ representando la primera etapa de la activación tisular. Finalmente, no se puede excluir una citotoxicidad directa ocasionada por la vegetación séptica, lo cual requiere ser demostrado más adelante.

En conclusión, el modelo de endocarditis experimental presentado en este estudio es económico, reproducible, y puede utilizarse para el estudio de la apoptosis y los mecanismos de daño endotelial inducido por diversos microorganismos.

Agradecimientos

Este estudio fue apoyado con fondos del proyecto de investigación conjunta México-Francia-ECOS-ANUIES-SEP-CONACYT M06-S02, y terminado mediante Fondos para la Investigación Básica 2006, proyecto 55295.

Referencias

1. Hoen B, Alla F, Selton-Suty C et al. Changing profile of infective endocarditis: results of a 1-year survey in France. *JAMA* 2002; 288(1): 75-81.

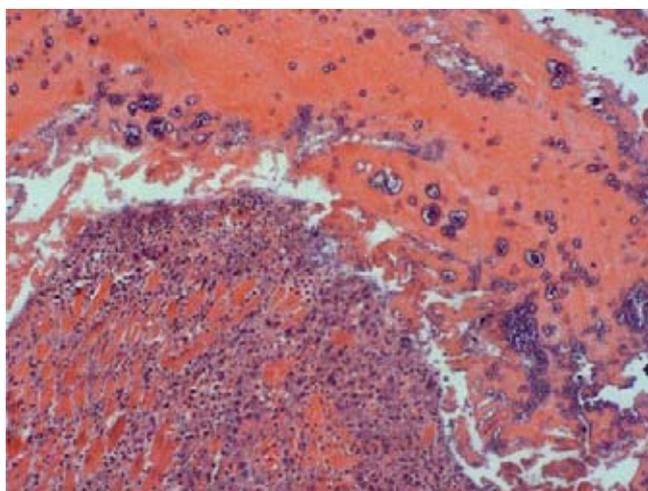


Figura 2. Trombo fibrinoplaquetario. Aspecto citológico. Obsérvese el infiltrado inflamatorio y la fibrina cubriendo gran parte del trombo. (Hematoxilina y eosina X400).

2. Ferreiros E, Nacinovich F, Casabe JH et al. Epidemiologic, clinical, and microbiologic profile of infective endocarditis in Argentina: a national survey. The Endocarditis Infecciosa en la República Argentina-2 (EIRA-2) Study. *Am Heart J* 2006; 151(2): 545-552.
3. Moreillon P, Que YA. Infective endocarditis. *Lancet* 2004; 363(9403): 139-149.
4. Widmer E, Que YA, Entenza JM et al. New concepts in the pathophysiology of infective endocarditis. *Curr Infect Dis Rep* 2006; 8(4): 271-279.
5. Durack DT, Beeson PB. Experimental bacterial endocarditis. I. Colonization of a sterile vegetation. *Br J Exp Pathol* 1972; 53(1): 44-49.
6. Que YA, Haefliger JA, Piroth L et al. Fibrinogen and fibronectin binding cooperate for valve infection and invasion in *Staphylococcus aureus* experimental endocarditis. *J Exp Med* 2005; 201(10): 1627-1635.
7. Thiagarajan P, Tait JF. Binding of annexin V/placental anticoagulant protein I to platelets. Evidence for phosphatidylserine exposure in the procoagulant response of activated platelets. *J Biol Chem* 1990; 265(29): 17420-17423.
8. Thiagarajan P, Tait JF. Collagen-induced exposure of anionic phospholipid in platelets and platelet-derived microparticles. *J Biol Chem* 1991; 266(36): 24302-24307.
9. Hunter AL, Choy JC, Granville DJ. Detection of apoptosis in cardiovascular diseases. *Methods Mol Med* 2005; 112: 277-289.
10. Rouzet F, Domínguez-Hernández M, Sarda-Mantel L et al. Functional imaging of vegetations in experimental endocarditis by ^{99m}Tc-Annexin V scintigraphy. *Circulation* 2007 (en curso de impresión).
11. Fantin B, Pangon B, Potel G et al. Ceftriaxone-netilmicin combination in single-daily dose treatment of experimental *Escherichia coli* endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33(5): 767-770.
12. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992; 119(3): 493-501.
13. Touat Z, Ollivier V, Dai J et al. Renewal of mural thrombus releases plasma markers and is involved in aortic abdominal aneurysm evolution. *Am J Pathol* 2006; 168(3): 1022-1030.
14. Modi WS, Yoshimura T. Isolation of novel GRO genes and a phylogenetic analysis of the CXC chemokine subfamily in mammals. *Mol Biol Evol* 1999; 16(2): 180-193.
15. Singer M, Sansonetti PJ. IL-8 is a key chemokine regulating neutrophil recruitment in a new mouse model of Shigella-induced colitis. *J Immunol* 2004; 173(6): 4197-4206.
16. Schlatmann TJ, Becker AE. Histologic changes in the normal aging aorta: implications for dissecting aortic aneurysm. *Am J Cardiol* 1977; 39(1): 13-20.
17. Bonderman D, Gharehbaghi-Schnell E, Wollenek G et al. Mechanisms underlying aortic dilatation in congenital aortic valve malformation. *Circulation* 1999; 99(16): 2138-2143.
18. Meilhac O, Ho-Tin-Noe B, Houard X et al. Pericellular plasmin induces smooth muscle cell anoikis. *Faseb J* 2003; 17(10): 1301-1303.
19. Lahteenmaki K, Edelman S, Korhonen TK. Bacterial metastasis: the host plasminogen system in bacterial invasion. *Trends Microbiol* 2005; 13(2): 79-85.
20. Menzies BE, Kourteva I. *Staphylococcus aureus* alpha-toxin induces apoptosis in endothelial cells. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2000; 29(1): 39-45.

Sopa de letras médicas

Definiciones de la terminología médica

Adeno—: Prefijo que indica relación con las glándulas.
Afonía: Pérdida de la voz.
Anal: Relativo al ano.
Ánodo: Electrodo o polo positivo que atrae iones negativos.
Ansia: Inquietud muy violenta.
Azar: Casualidad, caso fortuito.
Cardio—: Prefijo que indica relación con el corazón.
Daño: Efecto de dañar o dañarse.
Dedo: Cada una de las cinco prolongaciones en que terminan la mano y el pie. Todos están formados por tres falanges, excepto el primero (pulgares) que sólo tiene dos.
Emesis: Acción de vomitar.
Endo—: Prefijo que denota localización interna.
Eosina: Colorante rosa: característicamente sal sódica de tetrabromofluoresceína.
Fármaco—: Prefijo que denota relación con una droga o medicamento.
Fatiga: Estado de aumento de las molestias y disminución de la eficiencia, que resulta de ejercicio duradero o excesivo.
Hiato: Nombre general para anillo, orificio o fisura.
Infante: Periodo de la vida del hombre comprendido entre el nacimiento y los siete años de edad.
Iritis: Inflamación del iris caracterizado generalmente por dolor, congestión de la región ciliar, fotofobia, contracción de la pupila y alteraciones en el color del iris.
Laboratorio: Sitio equipado para efectuar trabajo experimental o procedimientos de investigación, preparar fármacos o sustancias químicas.
Mano: Parte de la extremidad superior después del antebrazo.
Miedo: Perturbación angustiosa del ánimo.

Mimos: Cariño, halago.
Mioma: Tumor constituido por elementos musculares.
Nasal: Perteneciente o relativo a la nariz.
Nido: Punto de origen o foco de un proceso mórbido.
Niño: Dícese del ser humano considerado de la infancia a la pubertad.
Oddi: Ruggero, médico italiano del S.XIX. músculo de (esfínter).
Oídos: Órganos de la audición y del equilibrio.
Omoplato: También llamado escápula.
Orines: Líquido excretado por el riñón. Pasa por el uretero, se almacena en la vejiga y se descarga por la uretra.
Óseo: Lo relativo al hueso.
Óvulo: Cualquier estructura pequeña de tipo huevo.
Rata: Son reservorios de los agentes infecciosos de peste, tifo, rabia, etc.
Sarna: Lesión de la piel por el ácaro del género *Sarcoptes scabiei*.
Sóleo: Músculo de la pantorrilla que unido a los gemelos por su parte inferior forma el tendón de Aquiles.
Sondeo: Inquirir con cautela.
Testículo: Cualquiera de las glándulas pares en forma de huevo que están situadas normalmente en el escroto.
Tifo: Enfermedad infecciosa transmitida por artrópodos y causada por especies de rickettsia.
Ulna: Hueso de los dos que forman el antebrazo (cúbito) el más largo y grueso.
Ultra—: Prefijo que significa más allá o denota exceso.
Uretra: Conducto membranoso que conduce la orina desde la vejiga hasta el exterior del cuerpo.
Vida: En general, los seres vivos comparten con el hidrógeno, el carbono, el oxígeno y el nitrógeno.