

Ritmo circadiano del receptor MT1 para melatonina en corazón de *Rattus norvegicus* "rata Holtzman" con endocarditis infecciosa

Huberto W. Noriega Córdova¹, José Llanos Quevedo²

¹Doctorando en Ciencias Biomédicas. Escuela de Postgrado de la Universidad Nacional de Trujillo-Trujillo-Perú. e-mail: huberto_1@hotmail.com

²Profesor Emérito. Departamento Académico de Química, Biológica y Fisiología Animal. Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo, Docente de la Escuela de Postgrado de la Universidad Nacional de Trujillo. e_mail:jllanosq@yahoo.com

Recibido: 21-10-2013

Aceptado: 06-02- 2015

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue demostrar las variaciones del ritmo circadiano (oscilaciones en un rango de 24 horas) del receptor MT1 en ratas Holtzman con endocarditis bacteriana. Se emplearon ratas macho Holtzman, de peso promedio de $250 \pm 5g$ las que se sincronizaron a ritmos de luz-oscuridad de 12:12h, alimentación en pellets y agua ad libidum. Se prepararon dos grupos experimentales, uno sano y otro infectado con *Staphylococcus aureus* con un inóculo de 5×10^6 UFC/ml aplicado vía vena caudal. El corazón fue perfundido en ambos grupos con PBS y luego se les realizó el tratamiento de deshidratación, incorporación en parafina y seccionamiento, para rastrear la expresión del receptor MT1 de melatonina por inmunohistoquímica, después se graficó la curva del ritmo circadiano a la que se le realizó el ajuste de mínimos cuadrados con el software Cosinor 2.0 y pruebas de ANOVA (empleándose el software Image J se obtuvieron los datos de densidad integrados (IndDen)) de un solo factor ($P < 0,05$) del software Minitab 16.0 y ROC con el software Stata 10.0. Aceptándose la hipótesis de que las curvas en las secciones cardiacas del grupo de ratas sanas no tiene variación significativa entre ellas, mientras que en grupo de ratas con endocarditis si hay diferencias significativas entre cada sección cardiaca (alta, media y baja). Pudiéndose concluir que la expresión del receptor MT1 para melatonina en corazón de ratas se magnifica significativamente y se invierte el ritmo circadiano en un proceso infeccioso, infiriendo que la bacteria condiciona molecularmente la expresión de más receptores MT1

Palabras clave: Ritmo circadiano, endocarditis bacteriana, melatonina, inmunohistoquímica, receptor MT1

ABSTRACT

The aim of this study was to demonstrate circadian variations (oscillations in the range of 24 hours) of MT1 receptor in Holtzman rats with bacterial endocarditis. Holtzman male rats were used, average weight $250 \pm 5g$ which were synchronized to light-dark rhythm of 12: 12h, food pellets and water ad libitum. Two experimental groups, one healthy and one infected with *Staphylococcus aureus* with an inoculum of 5×10^6 CFU / ml applied via tail vein were prepared. The heart was perfused in both groups with PBS and then were subjected to the dehydration treatment, inclusion in paraffin and sectioning, to track the expression of MT1 receptor of melatonin by immunohistochemistry after curve circadian rhythm was plotted to which it performed the least-squares fit to the 2.0 software and Cosinor ANOVA (employing the Image J software integrated density data (IndDen) were obtained) single factor ($P < 0.05$) of Minitab 16.0 software and ROC Stata 10.0 software. Accepting the hypothesis that the curves in heart sections of the group of healthy rats no significant variation between them, while in the group of rats with endocarditis if there are significant differences between every (upper, middle and lower) section heart. Be concluded that the expression of MT1 melatonin receptor in rat heart was significantly magnified and circadian rhythm reverts to an infectious process, inferring that the molecularly bacteria affects the expression of more receptors MT1

Keywords: Circadian rhythm, bacterial endocarditis, melatonin, immunohistochemistry, MT1 receptor

I. INTRODUCCIÓN

Los ritmos circadianos, cuya periodicidad fluctúa alrededor de 24 h, regulan todos los sistemas fisiológicos, por ejemplo, en el hombre la alternancia diaria de sueño y vigilia se acompaña de numerosos ritmos en la función neural y endocrina (Ritcher HG., 2004). Produciéndose variaciones diarias en la temperatura corporal, frecuencia respiratoria, cardíaca, en la presión, composición de la sangre y casi todas las funciones corporales, en ausencia de patrones ambientales definidos (luz u oscuridad constantes) del organismo que están en libre curso o "free running", mostrando variaciones con un período cercano (circadianas) al experimentado antes del aislamiento (Emery P., et al. 2000). Estas observaciones indican la existencia de un "reloj endógeno", cuya periodicidad es de aproximadamente 24 horas ("circa" 24 horas, unas 25 horas en el hombre) (Münch M., 2005).

En los organismos pluricelulares el conjunto de células que muestra oscilación circadiana en órganos y tejidos están sincronizadas por un nivel jerárquicamente superior, el oscilador primario, sobre el cual los "zeitgebers" o cronometradores, son factores que influyen en el tiempo del reloj circadiano. El zeitgeber primario para el reloj central (o maestro), es la luz, mientras que los relojes periféricos (es decir, aquellos distintos del reloj central) están influenciados por factores neurohormonales (Durgan et al, 2005). En los mamíferos y las aves, este oscilador maestro se halla en el hipotálamo anterior, en el núcleo supraquiasmico (NSQ) y relojes periféricos localizados en la retina, hígado, corazón, pulmón, riñón y pars tuberalis, entre otros (Aguilar R y et al., 1997, Kräuchi K. et al., 1997 y Richter HG et al, 2004). En los mamíferos, el sistema circadiano está compuesto por un componente visual, integrado por fotorreceptores acoplados a vías visuales que median la sincronización, estructuras marcapasos que generan la señal circadiana y vías eferentes desde los marcapasos a los sistemas efectores (De Prins J., 2000).

En base a sus propiedades cinéticas, de especificidad y localización en el sistema nervioso central (SNC) se han identificado distintos receptores para la melatonina. Una primera clasificación de los receptores de melatonina en tipo ML1 y ML2 se basó en las diferencias cinéticas y farmacológicas de la unión específica al ligando 2-125 I-iodomelatonina. La International Union of Basic and Clinical Pharmacology (IUPHAR) ha propuesto recientemente una nomenclatura en concordancia con lo establecido para otros receptores. Los dos subtipos de receptores para melatonina clonados en mamíferos, llamados, según IUPHAR, MT1 y MT2 (inicialmente conocidos como Mel1a y Mel1b), estos receptores MT1 y MT2 pertenecen a la superfamilia de receptores asociados con proteínas G. Estos receptores median la inhibición por melatonina de la adenilato ciclasa. (Hermida RC. et al., 2004). Los efectos circadianos receptores de la melatonina MT1 modulan el disparo neuronal, vasoconstricción arterial, la proliferación celular en las células cancerosas, y las funciones reproductivas y metabólicas, que va seguido de la formación de melatonina, ya que se expresa en los NSQ y la pars tuberalis, considerados los sitios de acción circadiana y estacional de la melatonina (Krauchi K. y et al., 1997 y Dubocovich ML. & M. Markowska, 2005).

La endocarditis infecciosa se produce preferentemente por bacterias, que según el grado de virulencia, son capaces de lesionar válvulas sanas o sólo las dañadas previamente. En especial la eficacia de la terapia antibiótica ha hecho que la endocarditis aguda sea rara hoy en el material de autopsias y que, en parte, haya sido reemplazada por formas frustras (síntomas atenuado o cuando el cuadro clínico se presenta de modo incompleto), con lesiones mixtas, destructivas y productivas. Esto no significa que no puedan distinguirse básicamente dos formas: la aguda y la subaguda (Cardozo A., 2006). La endocarditis aguda, llamada endocarditis maligna o séptica, se produce por gérmenes de alta virulencia, por *Staphylococcus aureus* (llamado estafilococo dorado) o por estreptococos. Esta enfermedad sin tratamiento antibiótico tiene un curso letal dentro de seis semanas bajo un cuadro séptico. Las lesiones consisten principalmente de necrosis, insudación (infiltración de células de defensa) y trombosis, acompañadas de abundantes gérmenes. Existen dos formas, una fulminante, la endocarditis ulcerosa, en que predomina la necrosis, y otra menos violenta, la endocarditis úlcerotrombótica, en que son más acentuadas la insudación y la trombosis. En la primera, los velos comprometidos son friables y muestran pérdida de tejidos en forma de ulceraciones o perforaciones. En la segunda, las masas trombóticas con abundantes gérmenes y leucocitos, asientan laxamente en la superficie erosionada de los velos, que muestran abundante insudado leucocitario y no rara vez, focos necróticos. Las formaciones trombóticas se producen en la superficie de los velos que mira

contra la corriente. No es raro que por extensión esté comprometido el endocardio parietal (Cardozo, A., 2006).

La endocarditis infecciosa aguda puede producirse en las válvulas derechas o en las izquierdas y el compromiso de las válvulas derechas se produce en la actualidad preferentemente por inoculación, sea en pacientes que están con sondas que se infectan, o en drogadictos. La localización en las válvulas izquierdas, hoy más frecuente, y en la que de regla no se encuentra puerta de entrada, posiblemente tiene como punto de partida una tromboendocarditis infectada secundariamente, al parecer, en bacteremias que en otras condiciones no tendrían mayor trascendencia. La tromboendocarditis es importante también en la patogenia de estas formas infecciosas, en que las masas trombóticas, al comienzo asépticas, favorecen la anidación y proliferación de los gérmenes (Cardozo A., 2006).

En la endocarditis infecciosa subaguda o endocarditis lenta, la puerta de entrada casi siempre pasa inadvertida. La endocarditis misma representa el foco principal del proceso séptico. Macroscópicamente se trata de una endocarditis úlcero-poliposa, en la que microscópicamente se encuentran fenómenos necróticos, insudativos, trombóticos y productivos con desarrollo de tejido granulador. En principio, pero no siempre, pueden encontrarse gérmenes localmente, pero en cantidad mucho menor que en la forma aguda. Las formaciones trombóticas poliposas son adherentes y pueden sufrir calcificación, lo mismo que el tejido valvular alterado. La endocarditis subaguda produce con frecuencia graves deformaciones de las válvulas cardiacas (Cardozo A., 2006).

En el resto de los órganos suelen encontrarse infartos por embolias trombóticas, los cuales, a diferencia de los producidos en la forma aguda, no son supurados, pero muestran un componente inflamatorio. Al cuadro de la endocarditis infecciosa subaguda pertenecen, además, la glomerulonefritis de Löhlein, los nódulos de Osler debidos a una angeítis, y la miocarditis de Bracht y Wächter (Cardozo A., 2006).

Se han presentado varios modelos de endocarditis en ratas, desde el presentado por Durack & Beeson (1972) y Santoro & Levison (1978) y los que le han precedido tienen el mismo principio, la canulación quirúrgica, ya sea de la arteria carótida o de la vena yugular para poder lesionar las válvulas y facilitar la colonización de las bacterias.

Siendo el factor cronobiológico desatendido en los problemas de salud pública de los procesos infecciosos, se ha visto por conveniente tomar como modelo a la endocarditis bacteriana en *Rattus norvegicus* "rata" stock Holtzman (llamadas comúnmente ratas Holtzman), para poder establecer si existe variación del ritmo circadiano del receptor MT1 como indicador molecular del ritmo circadiano, para melatonina, durante un proceso infeccioso.

El objetivo general del presente estudio fue determinar el ritmo circadiano del receptor MT1 de melatonina en ratas Holtzman con endocarditis infecciosa. Los objetivos específicos fueron:

1. Determinar ritmo circadiano del receptor MT1 en corazón de *Rattus norvegicus* "rata" stock Holtzman, sin inducción de endocarditis infecciosa, por inmunohistoquímica.
2. Determinar el ritmo circadiano del receptor MT1 en corazón de *Rattus norvegicus* "rata" stock Holtzman, con endocarditis causada por *Staphylococcus aureus*, por inmunohistoquímica.
3. Realización de coloración Gram para verificar presencia de *S. aureus* agente etiológico de la endocarditis infecciosa
4. Realización de la coloración de hematoxilina.eosina a tejido cardiaco de rata Holtzman inoculadas con *S. aureus*, para determinar características propias de endocarditis infecciosa

II. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Objeto de estudio

Se emplearon 38 roedores machos del genero *Rattus norvegicus* "rata" stock Holtzman, obtenidas del Instituto Nacional de Salud-Lima-Perú

El cultivo puro de la bacteria *Staphylococcus aureus*, para la inducción de endocarditis, fue proporcionada por el Departamento técnico de microbiología de la EAP- Microbiología y

parasitología-UNT-Trujillo-Perú, aislada por hisopado faringe de pacientes del Hospital Regional Docente-MINSA-Trujillo

2.2 Métodos y técnicas

Se emplearon treinta y ocho especímenes *Rattus norvegicus* “rata” stock Holtzman procedentes del Instituto Nacional de Salud-Lima-Perú, machos y con peso promedio de $250\text{g} \pm 5\text{g}$ mantenidas en cámaras de sincronización con un fotoperiodo de 12 horas luz a 12 horas oscuridad, mantenidas bajo temperatura ($18\text{-}28^\circ\text{C}$) y un régimen de pellet y agua ad-libitum. Las ratas fueron tratadas y manipuladas en el laboratorio de química y fisiología animal de la Escuela académico profesional de microbiología y parasitología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo, tomando en consideración las recomendaciones internacionales del Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NAS, 2010) y Guidelines on Euthanasia of animals (AVMA, 2013)

La bacteria empleada fue *Staphylococcus aureus* (Departamento técnico de microbiología de la escuela académico profesional de microbiología y parasitología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo) Determinación de ritmo circadiano de de MT1 en ratas Holtzman sin inducción de endocarditis bacteriana

Determinación del ritmo circadiano de MT1 en ratas Holtzman sin inducción de endocarditis infecciosa

Se emplearon dieciocho ratas Holtzman machos, formándose seis grupos de tres ratas por grupos, las que se seleccionaron de modo aleatorio, organizados cada cuatro horas, el tiempo de partida fue a las 8:00am, siguiendo las 12:00pm, 4:00pm, 8:00pm, 12:00am y 4:00am. A cada hora mencionada se anestesiaron tres ratas con una mezcla de Ket-A-100® y Xygal® en proporción de 87mg/kg: 13mg/kg vía intramuscular respectivamente, una vez que a perdido la sensibilidad en la región plantar por punción con una aguja, se procedió a realizar la separación de piel hasta la zona torácica izquierda y luego una incisión en la región abdominal alta izquierda, hasta llegar al plano visceral para realizar un corte de las costillas ha aproximadamente 1,5cm del esternón hasta visualizar el corazón, e inmediatamente realizar una perfusión de 10,0ml de formol neutra bufferado a pH7, realizándose corte de la vena yugular para obtener inmediatamente el corazón sin coágulos de sangre y asegurando la fijación interna del tejido cardiaco, protegiendo así la degradación de los receptores MT1 para melatonina que se encuentren expresados. Posteriormente las muestras se conservaron, en frascos por separado, con formol neutro bufferado por un tiempo de 12h hasta un máximo de 24h, para luego realizar la etapa de procesamiento histológico.

Determinación de ritmo circadiano de MT1 en ratas Holtzman con inducción de endocarditis infecciosa

Se como referencia el modelo experimental de inducción de endocarditis en ratas de Santoro y Levison (1978). Se emplearon 18 ratas Holtzman machos, agrupándose en cuatro grupos de cinco ratas cada uno. Las ratas se sometieron a una operación de canulación de la arteria carótida derecha, para crear condiciones que faciliten la inducción de la endocarditis previa a la inoculación del microorganismo, empleándose como anestesia una mezcla de Ket-A-100® y Xygal® en la proporción de 87,0 mg/kg: 13,0 mg/kg respectivamente, de aplicación vía intramuscular; se procedió a la operación cuando no se detectó sensibilidad plantar por punción con una aguja.

Se rasuró inmediatamente la zona alta del tórax hasta la base del mentón, procediendo a desinfectar con Povidona®, para luego realizar el corte de piel y luego realizar la separación de tejido graso y conectivo, hasta ubicar al músculo estenohioideo, bajo este está la tráquea, se ubica en esa posición la arteria carótida y el nervio vago, ambos se separan con la ayuda de pinzas y se hizo pasar hilo de seda doble, uno sirvió para ligar la arteria cerca del triángulo carotideo y el otro para fijar la arteria a la cánula. Se realizó limpieza del tejido conectivo que esta sobre la arteria con la ayuda de pinzas de microdissección, terminada esta tarea, se procedió a usar un microclamp en la arteria carótida para cerrar la entrada de sangre del corazón, a continuación se realizó un corte en la arteria con unas tijera de resorte Mc Pherson-Vannas® y una pinza Dumont®. Previamente se tuvo preparada una jeringa de 1ml y una aguja modificada 30G unida a la cánula PE50 Clay Adams, la que esta con heparina sódica. La cánula se introdujo, y se avanzó hasta que se observó el pulso sanguíneo dentro de la cánula, como indicador de que la cánula está en el ápice del ventrículo izquierdo. Se procedió a ligar, el extremo de la cánula y luego a suturar con hilo de seda quirúrgico N°20, la especie operada se

deja en restrainers con papel toalla para absorber la orina, los cuales se cambian periódicamente hasta que la rata recupere su movilidad.

Transcurridas tres días de operadas se procede a inocular los animales. Las horas de inoculación se eligieron en función de los resultados obtenidos en la fase anterior, considerándose la hora de máxima, mínima, intermedia alta e intermedia en baja expresión del receptor MT1 para melatonina.

Se preparo un inoculo de 5×10^6 UFC/ml, realizándose una curva de crecimiento de la bacteria *Staphylococcus aureus*, que se mantuvieron en caldo infusión cerebro corazón a 35°C, los que se leyeron en un fotocolorímetro Klet summerson de filtro azul, para determinar a que hora se debe tomar el inoculo (Perronne et al, 1997).

Una vez determinado el tamaño de inoculo se procedió a inocular 0,4ml por la vena de la cola, con la construcción previa de un torniquete tipo pistón y previo rasurado de la zona basal de la cola, y la ayuda de una fuente de calor de luz infrarroja, que estimula la dilatación de la vena, se empleo una aguja 27G.

Las ratas se sacrificaron después de veinticuatro horas de haber sido operadas, como ya se explico en la sección anterior de experimentación.

Procedimiento de histología

Terminado el tiempo de fijación química se procedió a realizar la macroscópia del corazón, según el tratamiento que corresponda, dividiéndose el corazón en tres secciones transversales (alta, media y baja).

Las muestras se colocaron en canastillas de tejidos las que se colocaron en jarras porta canastillas las que se colocaron en un procesador de tejidos Autotechnicon hasta el día siguiente para que se deshidrate en alcohol etílico de 90, 95 y 100% Merck®, luego se desengrasa y aclara en Neoclear® y finalmente en parafina. Seguidamente se realizó la inclusión del tejido cardiaco en parafina para formar el taco (inclusión en parafina) la que se llevo al micrótopo Leica RM2025 para obtener cortes de 4,0um que se montaron en láminas de carga positiva para realizar la inmunohistoquímica y en láminas con albúmina de Mayer para realizar la coloración de Hematoxilina-Eosina. Antes de realizar uno u otro tratamiento, las láminas montadas se colocan en el horno a 50°C/20min para que desparafinen el exceso de parafina.

Las láminas de carga positiva con tejido cardiaco se colocaron en frascos de Copling con solución recuperadora de antígeno a 91°C/20min, luego se preparan el kit ImmunoCruz goat LSAB Staining system de Santa Cruz Biotechnology®, previo a este paso se realizó la titulación del anticuerpo primario, probándose las siguientes diluciones: 1/50, 1/100, 1/200 y 1/250 en tubos de Eppendorf, empleándose para esto solución de anticuerpo universal de laboratorios DAKO y anticuerpo primario anti-MT1 de rata obtenido en cabra.

Proceso de inmunohistoquímica

Se agregó la solución de bloqueo de la peroxidasa endógena por 5min. Enjuagar con solución buffer de lavado (PBS) y lavar por 2min, luego se añadió la solución bloqueadora de suero de *Capra hircus* "cabra" (suero de *Equus asinus* "burro") por 20min.

Se añadió el anticuerpo MT1 por 2h. Se enjuagó y lavó con PBS dos veces por 2min, luego se aplicó la solución de anticuerpo primario biotinado por 30min, se enjuagó y lavó con PBS por dos veces 2min, después se agregó la solución de sustrato HRP (1.6ml de agua desionizada, cinco gotas 10X buffer sustrato, una gota 50X del cromógeno DAB y una gota 50X del sustrato de la peroxidasa). Dejar por 30s a 10min, las muestra positivas desarrollan un color marrón. Se lavó con agua destilada.

Se contraste con hematoxilina 5 a 10s y lavó con agua desionizada. Se deshidrato en alcoholes de 90, 95 y 100% Merck® y luego en Neoclear®, montaje y estudiar microscópicamente.

Análisis de las imágenes

Se empleó el software **Image J** (para determinar el índice de densidad del marcaje con el anticuerpo anti-MT1)

Análisis estadístico

Se empleó el Software estadístico **Stata 10.0** (para calcular la curva ROC, de validación de la prueba inmunohistoquímica), **Microsoft Excel de Windows 7.0** (para graficar curva de ritmo circadiano), **Minitab 16.0** (para determinar el ANOVA) y **Cosinor 2.0** (un programa para calcular periodo circadiano (además de significar, amplitud y acrofase) por el método Cosinor)

III. RESULTADOS

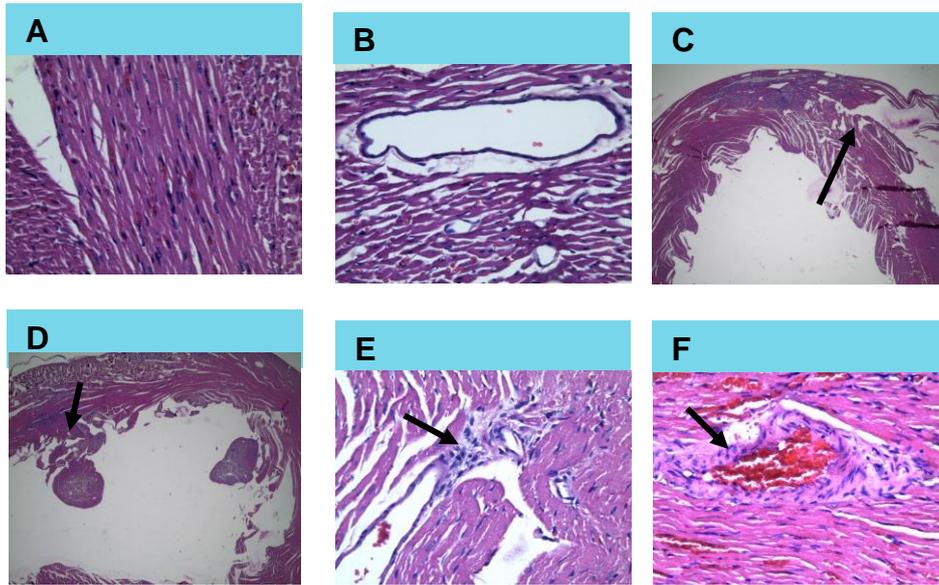


Fig 1. Tejido cardiaco de ratas Holtzman, en **A)** y **B)** sin endocarditis infecciosa a 10X, y en **C)** y **D)** con endocarditis infecciosa a 10X (la flecha indica infiltración de células de defensa en color azul) y en **E)** y **F)** se observan los cuerpos de Aschoff, (la flecha indica la presencia de células infiltradas con núcleos de color azul intenso, rodeadas de fibrina, de color blanco), a 40X, característicos en endocarditis infecciosa. Coloración de Hematoxilina/Eosina (H/E)

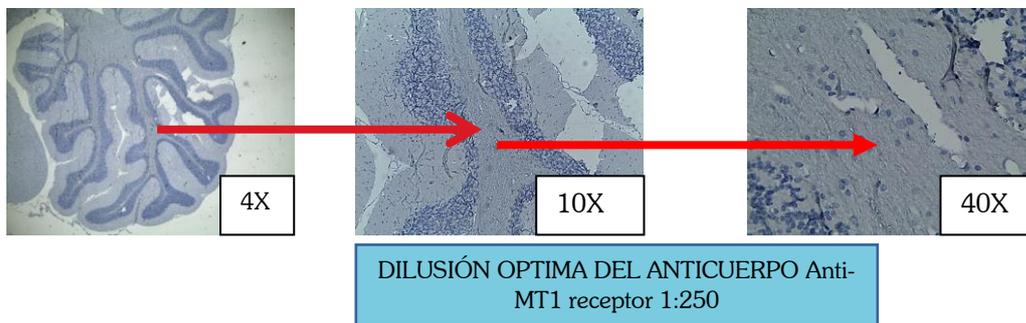


Fig. 2. Determinación la concentración óptima del anticuerpo anti MT1 por inmunohistoquímica del cerebelo de rata Holtzman como control positivo para el receptor MT1 para melatonina (la coloración marrón es el cromógeno que precipita en la zona de marcaje del receptor MT1 para melatonina),



Fig. 3 Tejido cardiaco de rata Holtzman marcado con el anticuerpo anti MT1 receptor, en A) sin endocarditis bacteriana y en B) con endocarditis bacteriana, observados a 40X



Fig. 4. Tejido cardiaco de ratas Holtzman con endocarditis infecciosa, en **A)** se observa cocos Gram positivos y en **B)** acúmulos de *S. aureus* en agregados de biopelícula (señalados en color azul) vistos a 100X

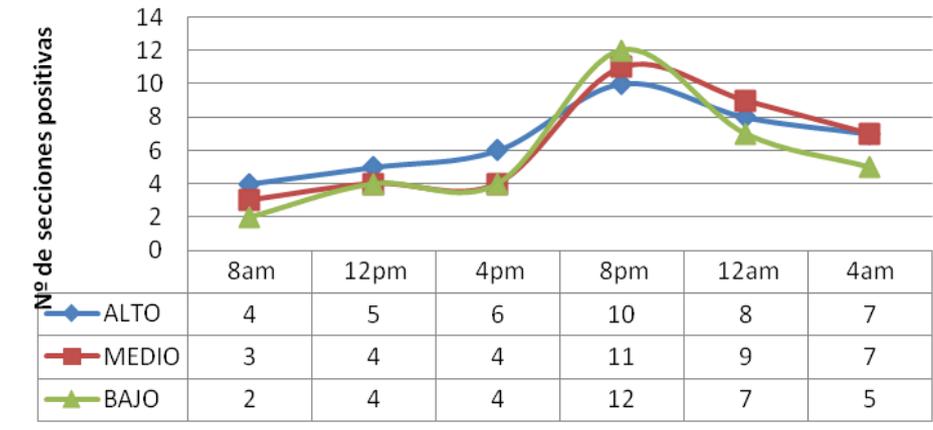


Fig.5. Ritmo circadiano del receptor MT1 para melatonina por inmunohistoquímica de tres zonas (alta, media y baja) del corazón de ratas Holtzman sin endocarditis infecciosa en función del tiempo

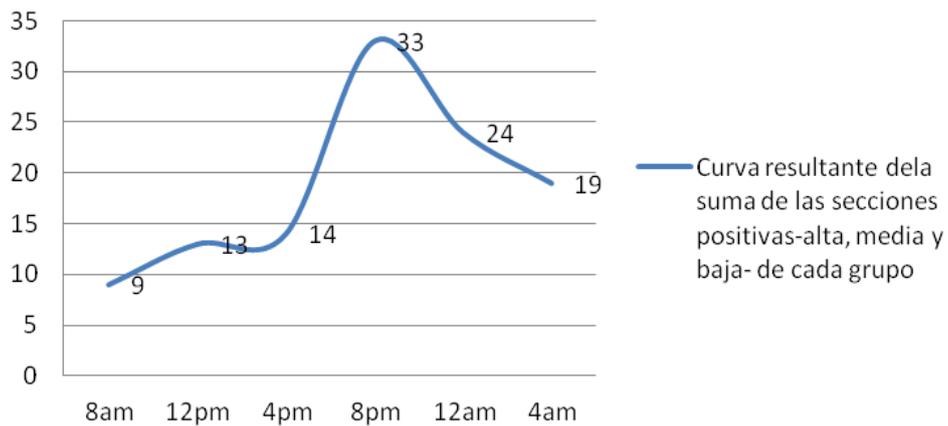


Fig. 6. Sumatoria del ritmo circadiano del receptor MT1 para melatonina de las tres zonas (alta, media y baja) del corazón de ratas Holtzman sin endocarditis bacteriana en función del tiempo

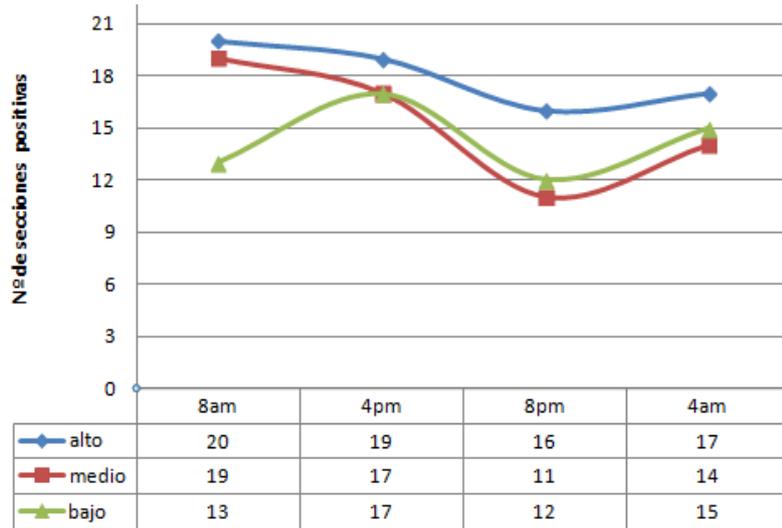


Fig. 7. Ritmo circadiano del receptor MT1 para melatonina por inmunohistoquímica de tres zonas (alta, media y baja) del corazón de ratas Holtzman con endocarditis bacteriana en función del tiempo

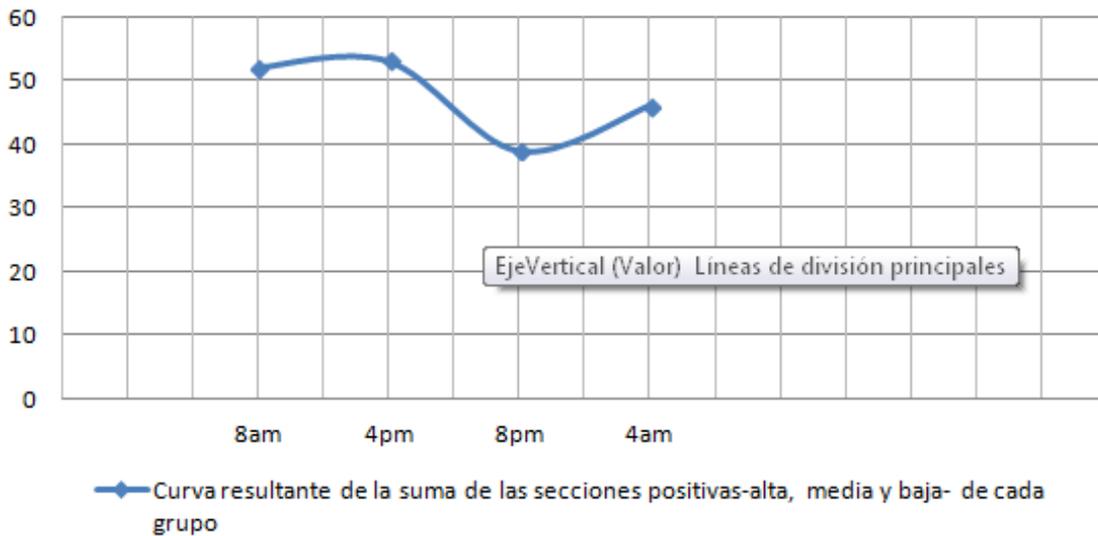


Fig 8. Sumatoria del ritmo circadiano del receptor MT1 para melatonina de tres zonas (alta, media y baja) del corazón de ratas Holtzman con endocarditis bacteriana en función del tiempo

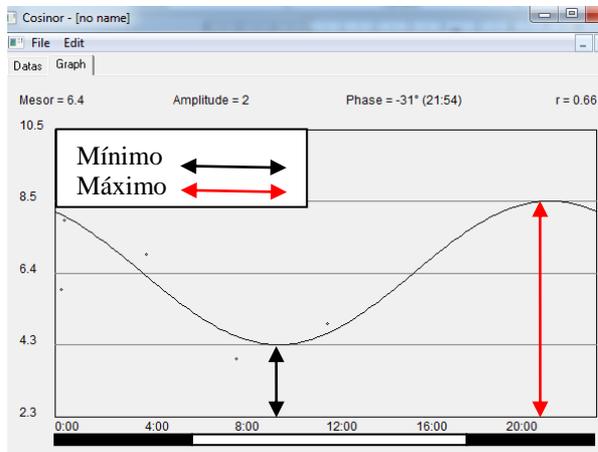


Fig.9. Ritmo circadiano del receptor MT1 de **zona alta** del corazón de ratas Holtzman sin endocarditis, ajustado por el software Cosinor

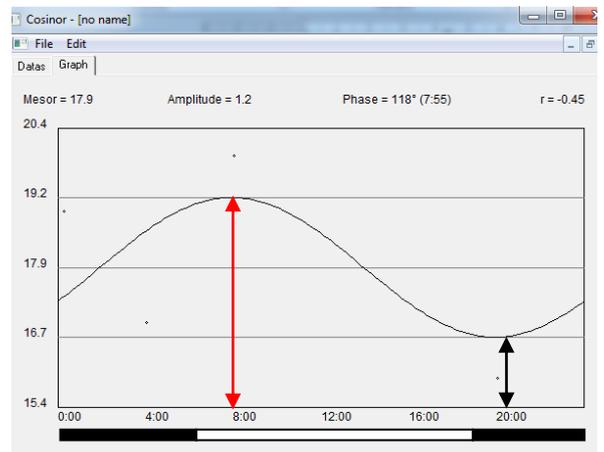


Fig.12. Ritmo circadiano del receptor MT1 de **zona alta** del corazón de ratas Holtzman con endocarditis, ajustado por el software Cosinor

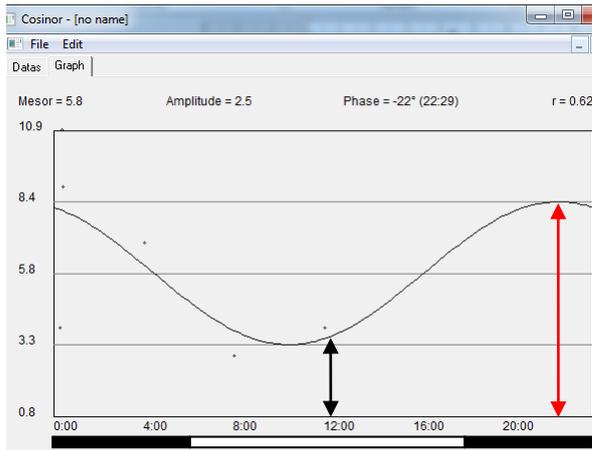


Fig. 10. Ritmo circadiano del receptor MT1 de **zona media** del corazón de ratas Holtzman sin endocarditis, ajustado por el software Cosinor

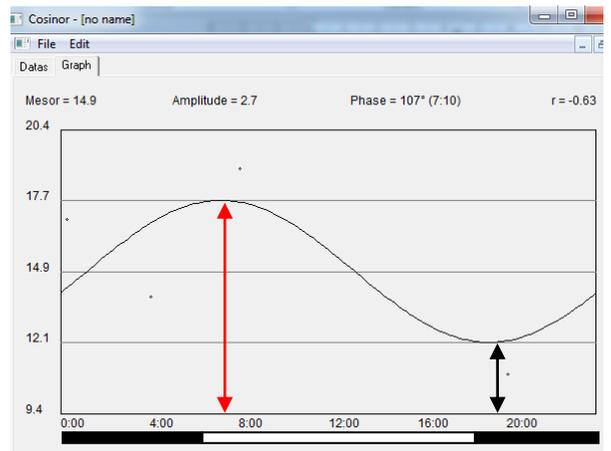


Fig. 13. Ritmo circadiano del receptor MT1 de **zona media** del corazón de ratas Holtzman con endocarditis, ajustado por el software Cosinor

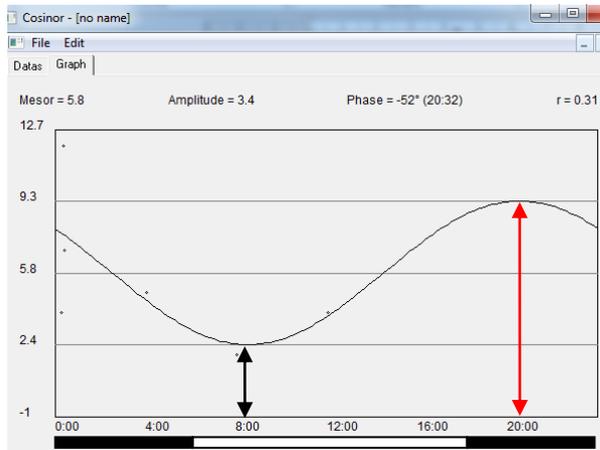


Fig. 11. Ritmo circadiano del receptor MT1 de **zona baja** del corazón de ratas Holtzman sin endocarditis, ajustado por el software Cosinor

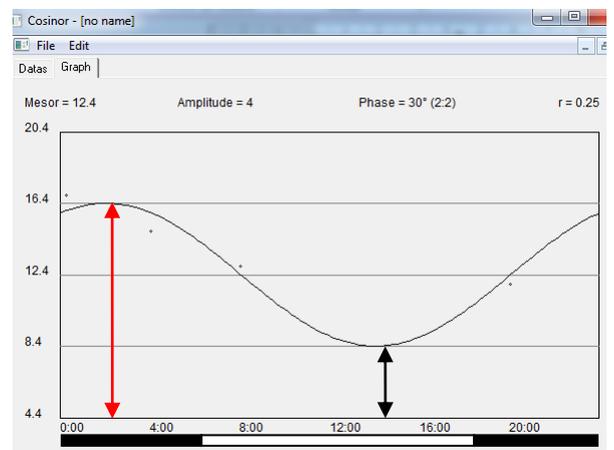


Fig. 14. Ritmo circadiano del receptor MT1 de **zona baja** del corazón de ratas Holtzman con endocarditis, ajustado por el software Cosinor

Tabla 1: Análisis de varianza de las curvas del ritmo circadiano del receptor MT1 para melatonina por inmunohistoquímica de tres zonas (alta, media y baja) del corazón de ratas Holtzman sin endocarditis infecciosa

Análisis de varianza de un factor						
RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
Columna 1	6	240624933	401041555	8,7487E+13		
Columna 2	6	264491122	44081853,67	3,32215E+13		
Columna 3	6	687041864	114506977,3	2,65356E+16		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Promedio de cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	2,10226E+16	2	1,0511E+16	1,182980188	0,33383	3,682320344
Dentro de los grupos	1,33282E+17	15	8,88544E+15			
Total	1,54304E+17	17				

Tabla 2: Análisis de varianza de las curvas del ritmo circadiano del receptor MT1 para melatonina por inmunohistoquímica de tres zonas (alta, media y baja) del corazón de ratas Holtzman con endocarditis infecciosa

Análisis de varianza de un factor						
RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
52962399	2	105793406	52896703	1.3588E+11		
530951884	2	1109285849	554642925	3.5195E+12		
535333886	2	1114224819	557112410	4.5144E+14		
410545918	2	646935436	323467718	4.4493E+13		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de la variación	de cuadrados de libertad	de los cuadrados	F	Probabilidad	valor crítico para F	
Entre grupos	3	1.1454E+17	917.061868	3.95011E-06	6.59138212	
Dentro de los grupos	4	1.249E+14				
Total	7	3.4411E+17				

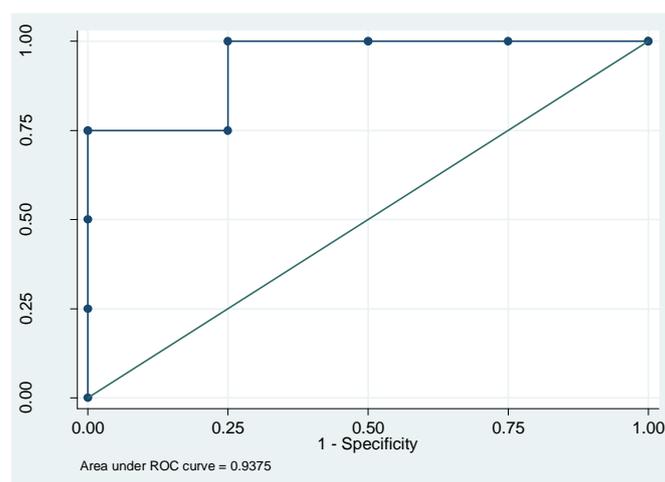


Fig. 15. Curva de características operativas (ROC) que valida de modo óptimo la prueba inmunohistoquímica con el anticuerpo anti-MT1 receptor para la determinación del ritmo circadiano del receptor MT1 para melatonina en corazón de ratas Holtzman con y sin endocarditis infecciosa

IV. DISCUSIÓN

La operación quirúrgica de canulación de la arteria carótida de *R. norvegicus* “rata Holtzman” fue un éxito, teniendo una mortalidad del 4%, mientras que en el promedio internacional es de 28.57% (Domínguez-Hernández MA. et al., 2009).

Los cuerpos de Aschoff, son focos de colágeno eosinófilo tumefacto, rodeado por linfocitos, es un indicador de endocarditis (Kumar V. et al., 2005), observándose señalados con una flecha en la Fig. 1. C, D, E y F en muestras de tejido cardiaco de *R. norvegicus* “rata Holtzman” por coloración de hematoxilina-eosina, estos cuerpos no son observables por inmunohistoquímica. La presencia de *S. aureus* no es fácil de observar ya que se realizó perfusión cardiaca con formol bufferado al 10%.

La presencia de los receptores MT1 para melatonina en el cerebelo, como control positivo, se evidencio en la Fig. 2. de modo óptimo a una concentración experimental de 1:250 del anticuerpo

anti MT1. Esta optimización es recomendada como parte del control de calidad ya que cada tejido de un órgano es diferente (Vaquero M., 2007). La curva Característica Operativa del Receptor (curva ROC), muestra en la Fig. 16, que la especificidad y sensibilidad lograda por inmunohistoquímica realizada es buena. Esto significa que los resultados obtenidos son confiables (Cerdeja J., 2012).

La Fig. 3 muestra tejido cardiaco de rata Holtzman con endocarditis infecciosa presentándose una reacción inmunohistoquímica positiva, destacándose que el tejido cardiaco de ratas con endocarditis infecciosa (Fig.3B) es un color marrón más intenso que el que no procede de ratas sin endocarditis infecciosa, lo que se interpreta como mayor expresión de los receptores MT1 para melatonina

En la Fig. 4. se visualizan cocos Gram positivos agregados entre si y adheridos próximos a región de válvulas de corazón perfundido, lo que indica que *S. aureus* interacciona con el tejido cardiaco de *R. norvegicus* "rata Holtzman" como se había previsto experimentalmente con la inoculación vía intravenosa de la cola, previa canulación de la arteria carótida derecha, así lo demuestran estudios experimentales de endocarditis infecciosa en donde la infección y la colonización bacteriana es dependiente de la permanencia de la cánula, la que genera una lesión al endocardio y válvulas para desencadenar una reacción inflamatoria iniciada con la presencia de fibrina que sirve de adherente a la bacteria en especial a *S. aureus* (Domínguez-Hernández MA. et al., 2009 y Gibson GW., 2007).

El ritmo circadiano del receptor MT1 de melatonina en corazón *R. norvegicus* "rata Holtzman" sin endocarditis (Fig. 5) muestra que la máxima expresión del receptor MT1 para melatonina es a las 8:00pm y la menor expresión a las 8:00am, destacando que el ritmo circadiano para la zona alta del corazón es mayor a las 8:00am y a las 8:00pm menor que el ritmo circadiano de la zona cardiaca media y baja. Haciendo una sumatoria de todas las secciones por zona (alta, media y baja) en función del tiempo, (Fig. 6), se registró un aumento moderado entre las 8:00am hasta las 4:00pm, pero en adelante hasta las 8:00 pm se observó una pendiente positiva muy acentuada de expresión del receptor MT1, y después de las 8:00pm se evidencio un descenso moderado de la expresión del receptor MT1 para melatonina hasta las 8:00am.

El receptor MT1 para melatonina en corazón de *R. norvegicus* "ratas Holtzman" con endocarditis (Fig. 7 y Fig. 8) mostro un pico máximo a las 8:00am y un mínimo a las 8:00pm. El ritmo circadiano para la zona alta es mayor que la zona media y baja a las 8:00 am, mientras que a las 8:00 pm la zona alta es mayor que la zona baja y la media respectivamente.

Las curvas sinusoidales obtenidas por análisis Cosinor describen el ritmo circadiano corregido del receptor MT1 para melatonina de *R. norvegicus* "rata Holtzman" sin endocarditis (Fig. 9, 10 y 11) y con endocarditis (Fig. 12, 13 y 14), destacando que los valores de amplitud de registros positivos del grupo de ratas Holtzman con endocarditis duplican a los del grupo sin endocarditis. Haciendo un comparativo entre los dos grupos respecto a sus valores máximos y mínimos entre el grupo de ratas Holtzman con endocarditis y el grupo control, se observó que en la zona alta del tejido cardiaco hay un adelanto de fase del valor máximo de 13h 59min y un retraso de fase del valor mínimo de 10h. En la zona media hay un adelanto de fase del valor máximo de 15h 19min y un retraso de fase del valor mínimo de 06h 41min. En la zona baja hay un adelanto de fase del valor máximo de 18h 12min y un retraso del valor mínimo de 05h 48min. Relacionando los valores máximos se evidencia en orden ascendente el grado de cambio de fase, siendo zona cardiaca alta media y baja; mientras que el cambio de fase para los valores mínimos fue en orden ascendente la zona cardiaca baja, media y alta, esto permite establecer que existe una coordinación y una magnificación de la respuesta celular ante un proceso infeccioso. Las ratas Holtzman sin endocarditis tienen sus valores mínimos de expresión del receptor MT1 en el día, siendo las zonas baja, alta y media de tejido cardiaco que primero alcanzan el mínimo, mientras que los valores máximos de expresión se efectúan en la noche, siendo la primera en alcanzar el máximo de expresión la zona baja, alta y media. Relacionando los valores máximos y mínimos en ratas Holtzman con endocarditis se observó que los valores mínimos se alcanzan a inicios de entrada a la noche, excepto la zona baja del corazón que se da entre el paso de día a noche (primero en alcanzar el mínimo fue la zona cardiaca baja, media y alta) y en el caso de los valores máximos se alcanzan iniciando el día, excepto la zona baja que se presenta entre el paso de la noche hacia el día (primero en alcanzar el máximo fue la zona baja, media y alta) lo que indica que las curvas que representan a cada zona del corazón de ratas con endocarditis son diferentes, demostrándose esto con la prueba de ANOVA, aceptándose la hipótesis de que las curvas en las secciones cardiacas del grupo de ratas sanas (TablaN°1)no tiene variación

significativa entre ellas, mientras que en el grupo de ratas con endocarditis (Tabla N°2) si hay diferencias significativas entre cada sección cardiaca (alta, media y baja). El organismo sano se caracteriza por un alto grado de orden temporal en su organización circadiana y las desviaciones de este orden son típicas de numerosos estados patológicos, un indicador de alteración cronobiológica es la alteración de la amplitud de los ritmos. Se ha establecido que la estabilidad de un sistema circadiano está vinculada positivamente con la amplitud. Los sistemas circadianos de fases lábiles presentan menores amplitudes, entonces las medidas que aumenten la amplitud son beneficiosas para el paciente (Quintero JE., 1999 & Yu Y-H., 2004). Esto hace inferir que la señal magnificada del receptor MT1 para melatonina en tejido cardiaco de ratas Holtzman con endocarditis infecciosa, es para mantener el equilibrio funcional del corazón. Los ciclos metabólicos pueden afectar directa o indirectamente el ritmo diurno de la función cardiovascular (Kohsaka et al, 2012). Con el fin de mantener el gasto cardíaco adecuado, el miocardio modifica el metabolismo en respuesta a una serie de influencias ambientales, en tanto el reloj circadiano de los cardiomiocitos permite que el corazón anticipe tensiones / estímulos ambientales, y si hay disincronía circadiana probablemente contribuye a la etiología de la enfermedad cardiovascular (Chatman & Young, 2013).

Como limitante del estudio no se pudo realizar la medición de la expresión genética del gen del receptor MT1 para melatonina por RT-PCR complementariedad del RNA mensajero, esto puede haber elevado la sensibilidad de los resultados, para poder superar esto, el corazón de las ratas sacrificadas se perfundio y de inmediato se los sumergió en una solución formol neutra bufferado a pH7 para detener la actividad metabólica a nivel celular y conservar los receptores MT1 para melatonina acoplados a membrana celular.

Se demostró que aquellos procesos infecciosos causados por bacterias pueden modificar el ritmo circadiano de un órgano, independientemente del control del reloj master ubicado en el NSQ y pars tubercularis, evidenciando la existencia de diferentes intensidades de expresión y a diferentes tiempos, en cada zona del tejido cardiaco investigada (zona alta, media y baja) de *R. norvegicus* "rata Holtzman"

Se propone al receptor MT1 para melatonina como un marcador de ritmo circadiano en ratas para estudios de cronoterapia, modulación de la expresión de genes y en procesos fisiopatológicos causados por bacterias. Este estudio es la primera descripción mundial del ritmo circadiano del receptor MT1 para melatonina en endocarditis infecciosa por *S. aureus* en ratas Holtzman.

V. CONCLUSIONES

1. Pudiéndose concluir que el ritmo circadiano del receptor MT1 para melatonina en tejido cardiaco de "ratas Holtzman" se magnifica el grado de expresión inmunohistoquímica significativamente y se invierte en la endocarditis infecciosa, infiriendo que la bacteria *S. aureus* condiciona molecularmente la expresión de más receptores MT1
2. Estos hallazgos de la variación del ritmo circadiano del receptor MT1 para melatonina pueden contribuir así a una mejor comprensión de la patogénesis *in vivo* por *S. aureus* y dar lugar a enfoques alternativos en la prevención o el tratamiento de endocarditis por estafilococos.

AGRADECIMIENTOS

Ph.D. Margaritha L. Dubocovich, Senior Associate Dean for Inclusion and Cultural Enhancement; Professor and Chair of Pharmacology and Toxicology University at Buffalo-USA, por sus sugerencias para determinar la dilución estándar del anticuerpo MT1

Mg. Jesús La Serna La Rosa, Laboratorios Nachacov-Lima representante de DAKO, por su asesoría técnica

Mg. Zevallos F. Nelly Responsable del Laboratorio de Inmunohistoquímica-INEN, por el entrenamiento en inmunohistoquímica

Dr. Cesar Llerena Vásquez, Dr. Plasencia Angulo Willy Dpto. de Patología Clínica y Anatomía Patológica por las facilidades de uso del microscopio Leica con cámara incorporada

Mg. Mblgo. Vergara Cornelio Larry Willy Dpto. de Patología Clínica y Anatomía Patológica por su entrenamiento en la técnica de histología histoquímica.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUILAR R., A. SALAZAR, J. ROJAS, C. ESCOBAR & L. CINTRA. (1997). Organization of circadian rhythmicity and suprachiasmatic nuclei in malnourished rats **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.** **273**. USA. PMID:9362295
- AVMA (2013). Guidelines on Euthanasia of animals. **American Veterinary Medical Association.USA**
<https://www.avma.org/KB/Policies/Documents/euthanasia.pdf>. Accedido el 15 de setiembre del 2013.
- CARDOZO A. (2006). Cátedra y clínica de enfermedades infecciosas. **Facultad de medicina. Montevideo. Uruguay.**
- CERDA J. y L. CIFUENTES. (2012). Uso de curvas ROC en investigación clínica. Aspectos teórico-prácticos. **Rev. Chil. Infectol.** **29(2)**. Santiago de Chile-Chile
http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182012000200003. Accedido el 27 de agosto del 2014.
- CHATHAM, JC., & YOUNG, ME. (2013). Regulation of myocardial metabolism by the cardiomyocyte circadian clock. **Journal of Molecular and Cellular of Cardiology.USA.** **55**, 139-146. DOI: 10.1016 / j.yjmcc.2012.06.016
- DE PRINS J. (2000). How to Define a Rhythm using a Scientific Methodology. **Centre culturel international de Cerisy, "Conversciences", 57-65.**
<http://www.euroestech.net/cerisy/cdurpumsuk.php>. Accedido el 9 de agosto del 2013.
- DOMÍNGUEZ-HERNÁNDEZ MA, II. HERNÁNDEZ, S. SÁNCHEZ, M. GONZÁLEZ, J R. GALINDO & J. BAPTISTE MICHEL. (2009). Apoptosis y endotelio vascular en un modelo experimental de endocarditis. **Rev. Fac. Med. UNAM** **52(2)**. México DF-México.
<http://www.medigraphic.com/pdfs/facmed/un-2009/un092d.pdf>. Accedido 28 de agosto del 2014.
- DUBOCOVICH ML. & M. MARKOWSKA. (2005). Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine*. Jul; 27 (2): 101-10
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16217123>. Accedido el 26 de agosto del 2014.
- DURACK, D. T., & BEESON, P. B. (1972). Experimental bacterial endocarditis: I. colonization of a sterile vegetation. ***British Journal of Experimental Pathology*, 53(1), 44-49.**
- DURGAN DJ, HOTZE MA, TOMLIN TM, EGBEJIMI O, GRAVELEAU C, ABEL ED, SHAW CA, BRAY MS, HARDIN PE, YOUNG ME. (2005). The intrinsic circadian clock within the cardiomyocyte. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** **289**: H1530-H1541. DOI: 10.1152/ajpheart.00406.2005
- EMERY, P., R. STANEWSKY, JC. HALL & M. ROSBASH (2000). ***Drosophila* cryptochromes: A unique circadian-rhythm photoreceptor.** ***Nature* 404, 456-457. DOI:10.1038/35006558, USA.**
- GIBSON GW, SC. KREUSER, JM. RILEY, WS. ROSEBURY-SMITH, CL. COURTNEY, PL. JUNEAU, JM. HOLLEMBAEK, T. ZHU, MD. HUBAND, DW. BRAMMER, JK. BRIELAND & MC. SULAVIK. (2007). Development of a mouse model of induced *Staphylococcus aureus* infective endocarditis. **Comparative Medicine**, **57(6)**, December 2007, pp. 563-569(7)

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18246868>. Accedido el 28 de agosto del 2014.
- HERMIDA RC., DE AYALA & C. GÓMEZ. (2004). Cronobiología y cronoterapia en la hipertensión arterial: implicaciones diagnósticas, pronósticas y terapéuticas. **Revista hipertensión. 21(5) 256 - 270.**
- KOHSAKA A, WAKI H, CUI H, GOURAUD SS, MAEDA M. (2012). Integration of metabolic and cardiovascular diurnal rhythms by circadian clock. **Endocr J. 2012; 59(6):447-56. DOI <http://dx.doi.org/10.1507/endocrj.EJ12-0057>**
- KRAUCHI K., C. CAJOCHEN, D. MORI, P. GRAW & A. WIRZ-JUSTICE. (1997). Early evening melatonin and S-20098 advance circadian phase and nocturnal regulation of core body temperature. **Psychiatric University Clinic, CH-4025 Basel, Switzerland. Am. J Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol. 272. 1178-1188.**
- KUMAR V., AK. ABBAS & N. FAUSTO. (2005). Robbins y Cotran Patología estructural y funcional. Cap. 12 El corazón. 7ma ed. Edit Elsevier-España, p. 598.
- MÜNCH M., S. KOBIALKA, R. STEINER, P. OELHAFEN, A. WIRZ-JUSTICE, & C. CAJOCHEN. (2005). Sleep and temperature regulation: Wavelength-dependent effects of evening light exposure on sleep architecture and sleep EEG power density in men. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 290.**
- PERRONNE, CM. RAFFAEL MALINVERNI, & MICHEL P. GLAUSERL. (1987). Treatment of *Staphylococcus aureus* endocarditis in rats with coumestrol and ciprofloxacin, alone or in combination. **Antimicrobial agents and chemotherapy, Apr., 31(4) 539-543.**
- QUINTERO JE. & DG. MCMAHON. (1999). Serotonin Modulates Glutamate Responses in Isolated suprachiasmatic nucleus neurons. **J Neurophysiol 82. 533-539.USA.**
- RICHTER HG., CI. TORRES-FARFÁN, PP. ROJAS-GARCÍA, C. CAMPINO, F. TORREALBA & M. SERÓN-FERRÉ. (2004). The circadian timing system: making sense of day/night gene expression. **Biol. Res. 37: 11-28.**
<http://www.scielo.cl/pdf/bres/v37n1/art03.pdf>. Accedido el 28 de agosto del 2014.
- SANTORO, J. & LEVISON, M. E. (1978). Rat model of experimental endocarditis. **Infection and Immunity, 19(3), 915-918.**
- VAQUERO M. (2007). Manual de calidad de manual de calidad de inmunohistoquímica inmunohistoquímica en anatomía en anatomía patológica. Edit. Osakidetza. Hospital Donostia. España
http://www.osakidetza.euskadi.net/r85sida01/es/contenidos/informacion/hd_publicaciones/es_hdon/adjuntos/ManualInmunohistoquimica.pdf. Accedido el 29 de agosto del 2014
- YU Y-H. & H. ZHU. (2004). Chronological changes in metabolism and functions of cultured adipocytes: a hypothesis for cell aging in mature adipocytes. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 286.**