

Presencia de *Chlamydia pneumoniae* en placas ateroscleróticas

Juan C. Méndez¹, Beatriz A. Montes¹, Ana María García¹, Juan Mesa², Alfonso Mejía³, Sergio Franco², Nelson Giraldo², Juan G. McEwen^{1,3}, Dagnovar Aristizábal^{1,2}

Resumen

Chlamydia pneumoniae es un patógeno mundialmente reconocido como causante de infecciones del tracto respiratorio en humanos. se caracteriza por ser un microorganismo intracelular obligado. Al presente, se ha comprobado su presencia en placas ateromatosas por múltiples técnicas como la inmunohistoquímica, la microscopía electrónica y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La enfermedad aterosclerótica es responsable de muchos de los accidentes cerebrovasculares y cardiovasculares. Sin embargo el papel patogénico de este microorganismo en dicha enfermedad aún no es claro.

En este estudio, por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se logró comprobar la presencia de *C. pneumoniae* en el 28% de 93 muestras de tejido vascular provenientes de pacientes que fueron sometidos a cirugía de revascularización quirúrgica. La presencia de este microorganismo en tejido vascular de pacientes con enfermedad coronaria podría considerarse como un factor de riesgo cardiovascular para el desarrollo de aterosclerosis y enfermedades cerebrovasculares.

Palabras claves: Aterosclerosis, Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), *Chlamydia pneumoniae*. ☉

Infectio 2005; 8(4): 250-254

Introducción

Chlamydia pneumoniae (TWAR)(1) es un patógeno común en infecciones del tracto respiratorio, incluyendo neumonía, bronquitis, sinusitis y faringitis; la infección es generalmente asintomática(2) y las reinfecciones son comunes durante toda la vida. En población general, la seroprevalencia en infantes menores de cinco años es muy baja, pero aumenta considerablemente en la edad escolar y en la edad media adulta (20-40 años) cuando alcanza valores del 50% y en adultos mayores de 40 años hasta 75% (1, 2).

C. pneumoniae es un microorganismo intracelular obligado ya que es incapaz de sintetizar adenosina trifosfato (ATP) y/o guanosina trifosfato (GTP), los cuales obtiene de la célula hospedera durante su fase de crecimiento y replicación. Tiene un ciclo bifásico que consta de cuerpos elementales infectantes y cuerpos reticulares que son la forma replicativa, además de exhibir similitud estructural en la pared trilaminar como las bacterias gram negativas. Se considera que el microorganismo se transmite por aerosoles y no se conocen variedades descritas actualmente (1, 3, 4).

Recibido para evaluación: 28/09/2004 Aceptado para publicación: 14/12/2004

¹ Unidad de Biología Celular e Inmunogenética, Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB), Medellín.

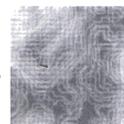
² Departamento de Cardiología, Clínica Medellín, Medellín

³ Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín. Sección Cardiología Depto. Medicina Interna, Facultad de Medicina Universidad de Antioquia, Medellín

Título corto: *C. pneumoniae* en aterosclerosis

Financiación: CODI Universidad de Antioquia, Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB), Medellín. Clínica Medellín, Medellín

Correspondencia: Dagnovar Aristizábal: Clínica Medellín Servicio de Cardiología Preventiva Of. 1508 Dirección: Calle 54 # 46-27. Teléfono: 511 7378 Fax: 512 2363 **E mail:** dagnovar@epm.net.co



Su presencia en placas ateroscleróticas ha sido descrita en diferentes investigaciones utilizando técnicas como la inmunofluorescencia, inmunohistoquímica, microscopía electrónica y reacción en cadena de la polimerasa (PCR), evidencia que indica una alta asociación con la enfermedad aterosclerótica. Pero no es claro aún su rol patogénico en el ateroma (3, 5).

En Colombia y el mundo, la segunda causa de muerte la constituyen las enfermedades del sistema circulatorio con una frecuencia del 29%, la Enfermedad Isquémica Cardíaca ocupa el primer lugar, seguida por la Enfermedad Cerebro Vascular (ECV) (6), siendo la aterosclerosis el fenómeno fisiopatológico común a estas enfermedades. Tales patologías son actualmente un problema de salud pública de especial atención en países industrializados y Colombia.

En la actualidad, la etiología de la aterosclerosis no es completamente conocida y se caracteriza por ser un proceso multifactorial. Comienza en etapas tempranas de la vida y es de evolución crónica. Se conocen una serie de factores de riesgo asociados, como lo son el tabaquismo, sedentarismo, hiperlipidemia, diabetes, hipertensión arterial y factores genéticos; sin embargo, estos factores de riesgo mencionados sólo explican de un 50 a 70% la incidencia de la enfermedad (7)

El propósito de este trabajo fue encontrar evidencia de la presencia de ADN de *C. pneumoniae* en muestras arteriales obtenidas de pacientes sometidos a revascularización quirúrgica utilizando la PCR en la ciudad de Medellín.

Materiales y métodos

Las muestras de tejido vascular fueron obtenidas de pacientes que fueron sometidos a proceso quirúrgicos de revascularización en la Clínica Medellín (Medellín, Antioquia). Éstas fueron almacenadas en solución salina y transportadas al laboratorio de referencia (CIB) en donde fueron congeladas a -20°C hasta el momento de realizar la extracción de ADN (8).

El ADN fue amplificado utilizando una PCR modificada, en la primera ronda se realizó PCR "TouchDown" (9), con los iniciadores HL1(5'GTTGTTTCATGAAGGCCTACT3') y HR1(5'TGCATAACCTACGGTGTGTT3') que generan una banda de 438pb. Las condiciones de amplificación para la segunda ronda fueron: 95°C por 3 minutos y 30 ciclos con los siguientes tres

pasos: 95°C por un minuto, 55°C por un minuto, 72°C por un minuto y finalizando con 72°C por 7 minutos. Los iniciadores utilizados para la segunda reacción fueron: IN1(5'AGTTGAGCATATTCGTGAGG3') e IN2(5'TTTATTCCGTGTCGTCCAG3') que amplifican en la región interna del primer amplicón y generan una banda de 123bp (10,11).

Los reactivos para las reacciones de PCR fueron: 50mM de KCl, 10mM Tris-HCl (pH 9.0), 0.1% de Tritón X-100, 0.2 pM de cada iniciador, 50uM de cada dNTP, 1.5mM de MgCl_2 y 1U de Taq DNA polimerasa, en un volumen final de 50 μl . Para la primera ronda de PCR se utilizaron 20 μl del ADN extraído y para la segunda se tomaron 10 μl del primer producto amplificado. Las muestras se visualizaron en geles de agarosa al 1,5% corridos a 100 voltios en buffer TBE 0,5X y teñidos con bromuro de etidio (12).

Todos las pruebas fueron realizadas por duplicado, los controles positivos fueron muestras positivas para *C. pneumoniae* previamente confirmadas. Como controles negativos de PCR se utilizó agua destilada desionizada estéril. Se determinó la proporción de muestras positivas para la amplificación de ADN de *C. pneumoniae* en el total de las muestras. Para esta publicación como estudio descriptivo no se tuvieron en cuenta las variables clínicas ni epidemiológicas.

Resultados

Se detectó la presencia de *C. pneumoniae* en un 28% de un total de 93 muestras analizadas distribuidas de la siguiente forma: las arterias mamarias utilizadas para revascularización quirúrgica mostraron un 37,5%(12/36) de positividad, mientras que las arterias radiales utilizadas igualmente en el mismo proceso mostraron un 22,5% (6/22). Las muestras de ateromas fueron obtenidas de arterias coronarias derecha, arteria descendente anterior, arteria circunfleja y su índice de positividad fue del 22,5% (4/18). Arterias de otros lechos vasculares como válvula mitral, válvula aórtica, aneurisma aórtico, arterias miembros inferiores y carótidas que se clasificaron como otros, obtuvieron un porcentaje del 23.5% (4/17). El resumen de estos resultados se muestran en el tabla 1.

Discusión

La teoría de respuesta a la injuria describe cómo un proceso inflamatorio vascular a nivel local,

TABLA 1

Porcentajes y frecuencias encontradas para *Chlamydia pneumoniae* en diferentes arterias analizadas por PCR.

Tejido	Muestras	Positivas	%Positividad
*Ateromas	18	4	22.2
Mamarias	36	12	33.3
Radiales	22	6	27.3
**Otros periféricos	17	4	23.5
Total	93	26	28.0

* Coronaria derecha, arteria descendente anterior, arteria circunfleja.

** Válvula mitral, válvula aórtica, aneurisma aórtico, arterias miembros inferiores, Carótidas.

conlleva a la formación del ateroma (16). Cambios en la permeabilidad de la membrana del endotelio permiten la acumulación de lípidos y elementos fibrosos que estimulan la producción de moléculas de adhesión celular vascular (VCAM), moléculas de adhesión intercelular (ICAM), señales inflamatorias y quimiotácticas para macrófagos, monocitos y linfocitos(13,15). Una posible vía de infección *C. pneumoniae* parece ser a través de macrófagos alveolares que fagocitan el microorganismo y luego, por vía hematogena, son transportados a los diferentes sitios de la lesión aterosclerótica. Allí, el macrófago es activado por la presencia de lípidos de baja densidad oxidados (LDLox) y comienza una acumulación excesiva de ésteres de colesterol y LDLox en su citoplasma (célula espumosa), y adicionalmente con *C. pneumoniae* fagocitado, inducen la lisis del macrófago generando una respuesta inflamatoria agresiva que puede provocar la ruptura del ateroma, formación de trombos y oclusión total del flujo sanguíneo que causa isquemia de los tejidos adyacentes. Esta oclusión arterial es la principal causante de anginas de pecho o ataques al corazón (13,14,15,16).

En la actualidad se sabe que existen factores predisponentes para el desarrollo de la aterosclerosis. Sin embargo *C. pneumoniae* ha sido un espectador ignorado en la génesis y/o recrudescimiento de la aterosclerosis en asociación importante con las ECV y EC. La evidencia mostrada en nuestro estudio y la de otros investigadores puede sustentar que la presencia de *C. pneumoniae* tenga una alta relación con el proceso aterosclerótico, de tal forma que *C.*

pneumoniae podría convertirse en un potencial candidato para ser un factor de riesgo cardiovascular de tipo infeccioso aún no claramente estudiado (3).

Sin embargo, actualmente existe una alta variabilidad entre las diferentes pruebas para la detección *C. Pneumoniae*(5). La microinmunofluorescencia es la prueba de oro para la detección de anticuerpos (ac) contra *C. pneumoniae*, pero es dependiente del estado infeccioso en que se encuentre el paciente. La fijación de complemento detecta anticuerpos contra lipopolisacáridos de membrana pero no diferencia entre las infecciones por *C. psittaci*, *C. trachomatis* y *C. pneumoniae*. Las pruebas serológicas proveen información inespecífica sobre la infección por este microorganismo y no precisan sobre su presencia en el ateroma. El aislamiento de *C. pneumoniae* en cultivos celulares es dispendioso, con una baja sensibilidad y de alto costo. Aunque todos los resultados positivos obtenidos por estos métodos se aceptan como verdaderos positivos, sigue existiendo un substancial controversia y una falta de concordancia entre los resultados, pues oscilan entre frecuencias de 0 y 100%. Esta discrepancia en la interpretación de los resultados deja entrever la ausencia de un método estandarizado para la detección de la presencia del microorganismo (1,3,4,5,17).

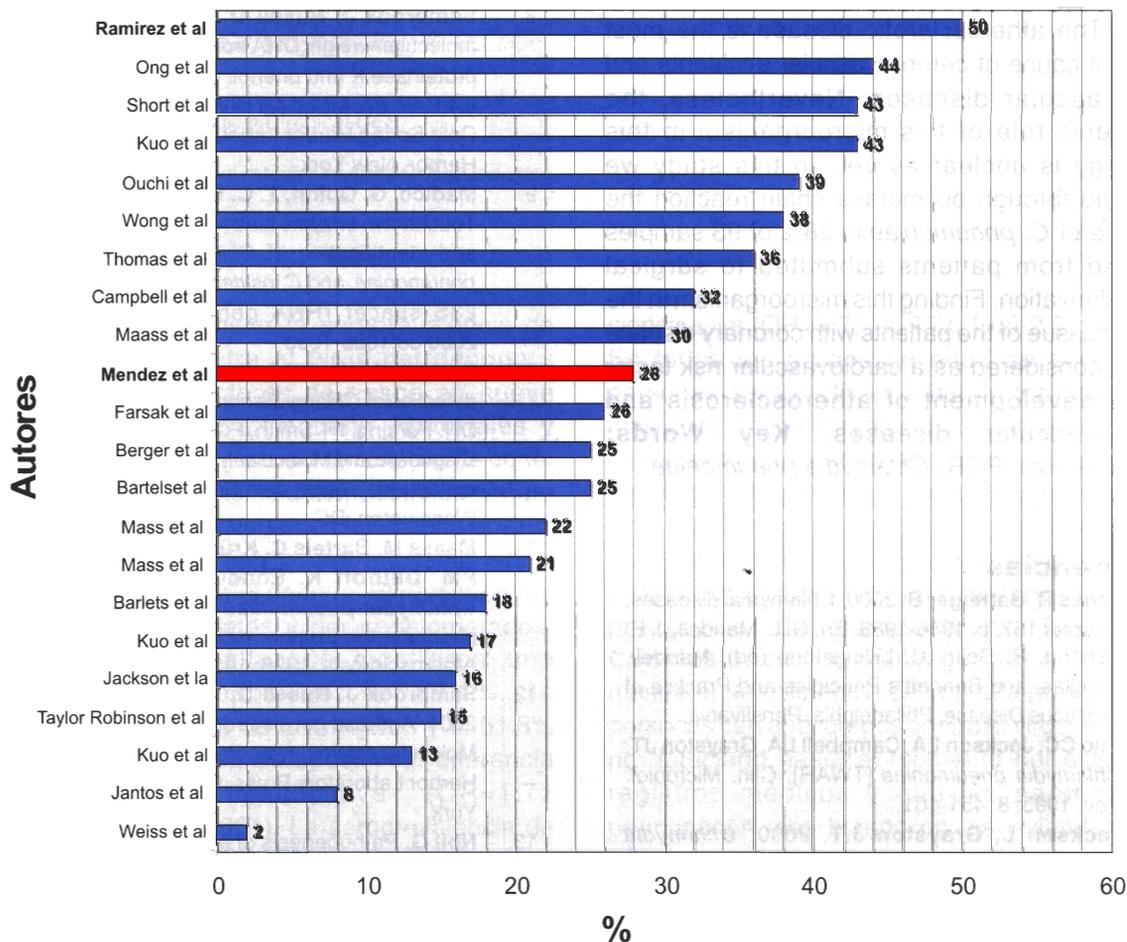
La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) podría ser una herramienta atractiva en la detección de *C. pneumoniae*. Ella puede incrementar significativamente la detección *C. pneumoniae* hasta en un 25% o más en comparación con el aislamiento en cultivo celular. La facilidad y especificidad de la técnica y el tiempo de obtención de resultados dan ventajas sobre los otros métodos antes descritos. No obstante, se ha encontrado discordancia en las frecuencias de los hallazgos positivos entre diferentes investigadores, posiblemente debido a variaciones en la estandarización, extracción y estrategias de amplificación utilizadas, más que en la técnica misma de PCR (5,17).

Los hallazgos en este estudio mostraron algo importante, en todos los tejidos analizados se encontró presencia de ADN de *C. Pneumoniae*. Las frecuencias encontradas en nuestra muestra poblacional fueron en promedio del 27% de positividad de todos los tejidos analizados (ver tabla 1), este hallazgo podría estar de acuerdo con que *C. pneumoniae* puede viajar a través de macrófagos y alojarse en diferentes



TABLA 2

Panorama mundial de las frecuencias de positividad para *C. pneumoniae* obtenidas por PCR de muestras de arterias y vasos periféricos



*Basado en Bowman y et al. (5)

techos vasculares, participando allí, en procesos inflamatorios que pueden conllevar al inicio, desarrollo y lisis de los ateromas(16). Además, los tejidos vasculares analizados provienen de pacientes con problemas ateroscleróticos confirmados, lo que aumenta la probabilidad de encontrar *C. pneumoniae*. Y posiblemente focos de diseminación hacia otras arterias propensas al desarrollo de ateromas.

Este estudio arroja más evidencia acerca de que *C. Pneumoniae* tiene una alta relación con la enfermedad aterosclerótica y por ende con las ECV y EC. Si consideráramos este microorganismo como un factor de riesgo cardiovascular, éste podría

tener un gran impacto en el desarrollo de nuevas estrategias y conductas terapéuticas en relación con la prevención y tratamiento de accidentes cardiovasculares.

Agradecimientos al Dr. Edwin García y La Dra. Ángela Restrepo por su colaboración en el desarrollo del proyecto.

Abstract

Chlamydia pneumoniae is a pathogen distributed worldwide and often associated with lower respiratory tract infections in humans; it is an

obligated intracellular microorganism. Actually, its presence in atheromatous plaques has been determined by multiples techniques such as microimmunofluorescence, immunocytochemistry, electron microscopy and polymerase chain reaction (PCR). The atherosclerotic disease is the most important cause of cerebrovascular accidents and cardiovascular diseases. Nevertheless, the pathogenic role of this microorganism in this pathology is unclear as yet. In this study we confirmed through polimerase chain reaction the presence of *C. pneumoniae* in 28% of 93 samples obtained from patients submitted to surgical revascularization. Finding this microorganism in the vascular tissue of the patients with coronary disease may be considered as a cardiovascular risk factor for the development of atherosclerosis and cerebrovascular diseases. **Key Words:** atherosclerosis, PCR, *Chlamydia pneumoniae*.

Referencias

1. **Jones R, Batteiger B.** 2000. Chlamydial diseases. Chapter 167. p. 1986-1988. En: G. L. Mandell, J. E. Bennett, R. Dolin, C. Livingstone (ed). Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Disease, Philadelphia, Pensilvania.
2. **Kuo CC, Jackson LA, Campbell LA, Grayston JT.** *Chlamydia pneumoniae* [TWAR]. Clin. Microbiol. Rev. 1995; 8: 451-461.
3. **Jackson L, Grayston J.T.** 2000. *Chlamydia pneumoniae* Chapter 170. p. 1986-1988. En: G. L. Mandell, J. E. Bennett, R. Dolin, C. Livingstone (ed). Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Disease, Philadelphia, Pensilvania.
4. **Grayston J.T.** Infectious caused by *Chlamydia pneumoniae* Strain TWAR. Clin. Infect. Dis. 1992; 15: 757-63.
5. **Boman J, Hammerschlag M.R.** *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis: critical assessment of diagnostic methods and relevance to treatment studies. Clin. Microbiol. Rev. 2002; 15: 1-20
6. Dirección Seccional de Salud de Antioquia - Revista Epidemiológica de Antioquia. 2000;25:83-92.
7. **Orfila J.J.** Seroepidemiological evidence for an association between *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis. Atherosclerosis 1998;140:S11-S15.
8. **Sambrook J. Rusell D.** 2001. Isolation of high molecular-weight DNA from mammalian cells using proteinase K and phenol. Chapter 6. Protocol 1. p. 6,4-6,12. En: Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. New York.
9. **Madico, G. Quinn, T. C. Boman, J. Gaydos, CA.** Touchdown enzyme time release-PCR for detection and identification of *Chlamydia trachomatis*, *C. pneumoniae*, and *C. psittaci* using the 16S and 16S-23S spacer rRNA genes. J Clin Microbiol. 2000;38:1085-1093.
10. **Campbell LA.** 1993. Part II. Section 1-11. PCR detection of *Chlamydia pneumoniae*. p: 247-252. En: DH. Persing, FT Smith, FC Tenover, TJ White (ed). Diagnostic and Molecular Microbiology principles and applications. American Society for Microbiology. Washington, DC.
11. **Maass M, Bartels C, Krüger S, Krause E, Engel P.M. Dalhoff K.** Endovascular presence of *Chlamydia pneumoniae* DNA is a generalized phenomenon in atherosclerotic vascular disease. Atherosclerosis, 1998; 140: s25-s30.
12. **Sambrook J. Rusell D.** Chapter 5. protocol 1,2. 2001. Agarose gel electrophoresis. P 5,5-5,17. En: Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. New York.
13. **Noll G.** Pathogenesis of athrosclerosis: a possible relation to infection. Atherosclerosis 1998;140:S3-S9.
14. **Kuo C, Campbell LA.** Is infection with *Chlamydia pneumoniae* a Causative Agent in atherosclerosis. Trends Mol Med. 1998;4:426-430.
15. **Aldon JL.** Atherosclerosis. Nature, 2000; 407: 233-241.
16. **Libby P.** Atherosclerosis the New View. Sci Am. 2002; 286: 47-55.
17. **Boman J, Gaydos C, Quinn T.** Molecular diagnosis of *Chlamydia pneumonia* Infection. J Clin Microbiol. 1999; 37: 3791-3799.