

Chlamydia pneumoniae y enfermedad cerebrovascular

J. Linares-Palomino^a, J. Gutiérrez-Fernández^b, C. López-Espada^a,
E. Ros-Díe^a, J. Moreno-Escobar^a, T. Pérez^c,
M. Rodríguez-Fernández^b, M.^a C. Maroto-Vela^b

CHLAMYDIA PNEUMONIAE AND CEREBROVASCULAR DISEASE

Summary. Introduction. Chlamydia pneumoniae has relationship with atherosclerosis of carotid artery by seroepidemiological studies and by demonstration of the bacteria in atheromata. We made a case-control study to know the seroprevalence of chronic infection of C. pneumoniae and the presence of the bacteria in arterial biopsies. Patients and methods. The cases group was constituted by 26 patients undergoing carotid surgery. In the control group there were 50 patients without atherosclerosis and who underwent shipping of their varicose veins. There were matched for sex, age and smoking. We obtained serum samples to determinate IgG antibodies against MOMP by MIF and ELISA. In the cases group, we got the arterial biopsies from carotid artery, and from pudendal arteries in control group. We determined chlamydial DNA on the biopsies by heminested PCR (primers: HL-1, HM-1, HR-1). We measured fibrinogen in both groups. Results. By MIF technique, the seroprevalence was (IgG > 1:32) 69,23% cases versus 24% controls (OR: 7.12. CI: 2.47-20.48). The ELISA showed 76.92% of seropositivity in cases versus 16% in controls (OR: 17.5, CI: 95%: 5.35-57.23). The DNA of C. pneumoniae was found in 18 cases and 6 controls, ($p < 0.0001$, χ^2). We did not find any relationship between fibrinogen levels and groups. Conclusion. We think that there is a relationship between chronic infection with C. pneumoniae and carotid atherosclerosis. [ANGIOLOGÍA 2001; 53: 72-83]

Key words. Antibody. Atherosclerosis. Carotid stenosis. Case-control studies. Chlamydia pneumoniae. Polymerase chain reaction.

Introducción

La etiopatogenia infecciosa de la arteriosclerosis fue propuesta inicialmente por Osler en 1908 pero, al no poderse aislar ningún patógeno responsable, fue rápidamente desestimada [1]. En la década de los setenta se asoció a la arterios-

clerosis el virus del herpes simple y citomegalovirus [2,3], y más recientemente a *Helicobacter pilori* [4]. No fue hasta 1988 cuando Saikku et al [5] publicaron el primer estudio seroepidemiológico, en el que se describen valores elevados de anticuerpos circulantes frente a *Chlamydia pneumoniae* —bacteria intracelu-

^a Servicio de Angiología y Cirugía Vascular. ^b Servicio de Microbiología. Hospital Clínico Universitario San Cecilio. Granada. ^c Departamento de Microbiología. Universidad de Cádiz. Cádiz, España.

Correspondencia:

Dr. José Patricio Linares Palomino. Servicio de Angiología y Cirugía Vascular. Hospital Clínico Universitario San Cecilio de Granada. Av. Dr. Oloriz, 16. E-18012 Granada. Fax: +34 958 271 931. E-mail: jlinaresp@seacv.org

Este trabajo se publica con la autorización de REVISTA DE NEUROLOGÍA a quien pertenece el copyright. Cualquier autorización de reproducción debe ser solicitada a REVISTA DE NEUROLOGÍA. El trabajo debe ser citado con la siguiente referencia: REV NEUROL 2001;32:201-6.

© 2001, ANGIOLOGÍA

lar productora de infecciones respiratorias— en enfermos con arteriosclerosis coronaria. Estos hallazgos fueron corroborados por Grayston, descubridor de la bacteria en 1991, et al [6] y por el propio Saikku et al [7], en 1992, mediante un estudio posterior más amplio. Otros trabajos posteriores demostraron, incluso, la presencia de inmunocomplejos circulantes frente a *C. pneumoniae* en enfermos con cardiopatía isquémica [8]. En 1992 se hace público el primer trabajo en el que se detecta *C. pneumoniae* en tejido vascular arteriosclerótico [9], mediante inmunocitoquímica. En otros estudios este microorganismo ha sido detectado también por microscopía electrónica, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) e incluso cultivo de biopsias de pared arterioscleróticas de aorta, coronarias, femorales y carótidas [10].

Desde esa fecha, diversos trabajos han sugerido que la infección crónica por *C. pneumoniae* puede contribuir en la patogenia de la arteriosclerosis [11,12], desde distintas aproximaciones etiopatogénicas.

En este sentido, hemos planteado un estudio de casos y controles para evaluar la presencia de *C. pneumoniae* en la arteriosclerosis carotídea extracerebral. Fueron incluidos 26 pacientes, como casos, con estenosis carotídea hemodinámicamente significativa, y se compararon con 50 sujetos, controles, sin evidencia clínica alguna de arteriosclerosis. Se efectuaron determinaciones en suero de anticuerpos específicos frente a *C. pneumoniae*, y se obtuvieron biopsias arteriales para la detección de ADN de la bacteria mediante PCR. Se estudió la relación entre la clínica arteriosclerótica, la seroprevalen-

cia de los anticuerpos y la presencia de ADN de *C. pneumoniae* en las biopsias obtenidas.

Pacientes y métodos

Se realizó un estudio prospectivo, observacional, analítico, de casos y controles entre septiembre de 1998 y abril de 1999, en el Hospital Clínico Universitario San Cecilio de Granada, sobre pacientes atendidos por el Servicio de Angiología y Cirugía Vascular. Existió cegamiento en cuanto al procesamiento e interpretación de todas las determinaciones de laboratorio (serología, lípidos, fibrinógeno y determinación de ADN de *C. pneumoniae*).

Pacientes

Fueron incluidos como casos 26 pacientes consecutivos con estenosis carotídea, subsidiaria de tratamiento quirúrgico. La indicación de esta cirugía se estableció según dos tipos de criterios distintos: 21 pacientes con estenosis mayor del 70% y sintomatología de ACV o AIT previos, criterios NASCET [13]; y 5 con estenosis graves asintomáticas, con criterios ACAS [14].

El grupo control se constituyó con 50 sujetos con insuficiencia venosa crónica superficial, que precisaron cirugía de resección de varices. Fueron seleccionados en función de su edad (mayores de 55 años) y con la misma distribución respecto al sexo del grupo de casos. En todos se comprobó la ausencia de arteriosclerosis conocida (coronaria, cerebrovascular o periférica) mediante examen clínico, ECG basal y eco-Doppler carotídeo.

Los individuos de ambos grupos fueron informados de la posibilidad de incluirse en el estudio, y todos los que aceptaron (26 de 32 en el grupo de casos y 50 de 57 en el grupo de controles) firmaron un documento de consentimiento para su participación.

Se excluyeron de ambos grupos a los pacientes alérgicos a betalactámicos, dado que en estos casos la profilaxis antibiótica preoperatoria se hace con eritromicina.

Determinaciones clínicas

Se consideraron los siguientes parámetros clínicos y analíticos: edad, sexo, exposición al tabaquismo, obesidad (superior al 30% del peso teórico), tensión arterial sistólica, colesterol total, triglicéridos y fibrinógeno. Se consideró como expuestos al tabaco a los fumadores en activo y a los exfumadores que hubiesen fumado más de 10 años a lo largo de su vida.

Determinaciones serológicas

Se investigó la IgG frente a MOMP (proteína principal de membrana externa, específica de especie), mediante dos técnicas analíticas: inmunofluorescencia indirecta (IFI) (MRL, EE.UU.), y ELISA (Laboratorios Vircell, Granada). Se consideró serología positiva cuando los valores fueron mayores a 1:32 en la IFI, o superiores de 1,1 para la ELISA (cociente entre absorbencia de muestra y valor positivo límite).

Determinación del ADN de *C. pneumoniae* en biopsias

Las muestras histológicas se obtuvieron en el grupo de enfermos de las placas de ateroma, obtenidas en el curso de la ciru-

gía de tromboendarterectomía carotídea. En el grupo control se recogió un trozo de 1 cm de la arteria pudenda durante la cirugía de varices. Las biopsias fueron inmediatamente lavadas con suero fisiológico y se incluyeron en el medio de transporte y conservación estéril SPG (buffer de ácido glutámico, sacarosa y fosfato). Se refrigeraron entre -4 °C y -10 °C durante un período de 12 a 16 horas, para después mantenerlas a -70 °C hasta su posterior procesamiento mediante heminested PCR.

La técnica que se siguió fue una modificación de la inicialmente descrita por Capmbell [15]. Las muestras se homogeneizaron y de ellas se extrajo el ADN por digestión enzimática con proteinasa K. La primera PCR se realizó con los *primers* HL-1: GTTGTCATGAAGGCCTACT; y HR-1: TGCATAACCTACGGTGTGTT, usando un termociclador PerkinElmer 9600, y produjo un fragmento de 437 pares de bases. Sobre este producto se realizó una segunda PCR, utilizando de nuevo el primer HR-1 y el HM-1: GTGTCA-TTCGCCAAGGTAA. El resultado de esta segunda amplificación produjo un fragmento mas corto de solo 229 pares de bases. Todos los *primers* utilizados fueron del gen codificador de la MOMP. La lectura se hizo mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%. Como control interno de amplificación y de extracción del ADN se utilizó el gen de la beta-actina.

Análisis estadístico

El tratamiento estadístico se llevó a cabo mediante el programa SPSS (SPSS Inc. Versión 8.0. 1997) La regresión logística exacta se efectuó con el programa LogXact

Tabla I. Características basales de los sujetos estudiados.

Características	Casos	Controles	p
Edad media	65,38 ± 7,0	60,12 ± 3,49	<0,0001 ^a
Mayores de 60 años	76,9%	56%	0,073 ^b
Sexo varón	73,1%	80%	0,492 ^b
Exposición tabaco	73,1%	60%	0,258 ^b
Diabetes mellitus	30,8%	4%	0,002 ^c
HTA sistólica > 150 mmHg	42,3%	8%	<0,0001 ^b
Hipercolesterolemia > de 250	34,6%	4%	0,001 ^c
Hipertrigliceridemia > 150	34,6%	8%	0,008 ^c
Fibrinógeno	362,42 ± 97,99	355,0 ± 79,11	0,11 ^a
Obesidad	30,8%	28,2%	0,801 ^b

^a Test de la t de Student; ^b test de la χ^2 ; ^c test exacto de Fischer.

(Civiel Software Corporation. Versión 2.1. 1996). La comparación de las variables continuas se llevó a cabo mediante la t de Student o la U de Mann-Whitney, cuando no se aseguró la normalidad. Las variables discretas se analizaron mediante la prueba estadística de la ji al cuadrado o el test de Fischer, cuando alguno de los valores esperados fue inferior a 5. Con objeto de ajustar un modelo multivariante explicativo de la presencia de *C. pneumoniae* se usó la regresión logística exacta, y al modelo ajustado se le aplicó el test de Hosmer-Lemeshow.

Resultados

Se obtuvieron muestras aptas para ser procesadas en los 76 pacientes que participaron en el estudio; no hubo ninguna

pérdida ni destrucción accidental de material. Las características basales de los pacientes quedan reflejadas en la tabla I. En ambos grupos, el sexo y el hábito tabáquico tuvieron una distribución sin diferencias estadísticamente significativas. Respecto al factor de edad, hay que especificar que el grupo de los casos fue 5 años mayor que el grupo control; sin embargo, en ambos grupos la media de edad fue superior a los 60 años.

Hubo diferencias en cuanto a otras covariables estudiadas en este trabajo. La diabetes fue mucho más frecuente en el grupo de casos que en los controles. La presencia de hipercolesterolemia, considerada como aquella mayor de 220 mg/100 ml, fue significativamente mayor en el grupo de patología cerebrovascular. Similar comportamiento tuvieron las variables de: hipertrigliceridemia, conside-

Tabla II. Resultados de las determinaciones serológicas.

Anticuerpo	Antígeno	Técnica seropositividad	Seroprevalencia		Odds ratio IC al 95%
			Casos	Controles	
IgG	MOMP	IFI > 1:32	69,23%	24%	7,12 (2,47-20,48)
IgG	MOMP	ELISA > 1,1	76,92%	16%	17,5 (5,35-57,23)

rada como aquella mayor de 150 mg/100 ml; hipertensión, que la consideramos cuando la sistólica era mayor de 151 mmHg. Los niveles de fibrinógeno y la obesidad no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.

Seroprevalencia

El punto de corte, para considerar seroprevalencia positiva, mediante la técnica de ELISA, frente a MOMP, se estableció en 1,1. Con relación a la IgG la seroprevalencia fue del 76,92% en los casos frente al 16% de los controles. Esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0,0001$; χ^2). Supuso una odds ratio de 17,5 (intervalo de confianza al 95% de 5,35-57,23) (Tabla II). Se ha considerado la serología positiva para la técnica de IFI cuando los anticuerpos IgG, frente a MOMP, estaban presentes a diluciones iguales o superiores a 1:32. La distribución de los resultados supuso una seroprevalencia del 69,23% en el grupo de enfermedad cerebrovascular frente al 24% del grupo control. Esta diferencia es estadísticamente significativa ($p < 0,0001$; χ^2), y supuso una odds ratio de 7,125 con un intervalo de confianza al 95% de 2,47-20,48.

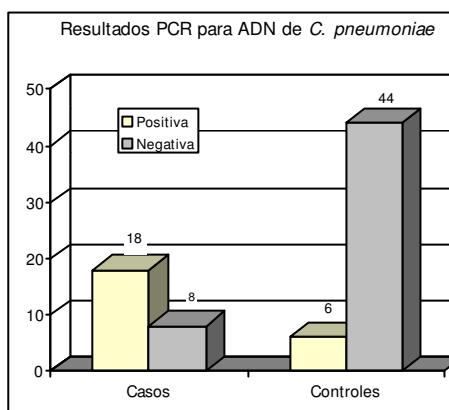


Figura. Presencia de ADN de *C. pneumoniae* detectada mediante heminested PCR en placas de ateroma carotídeo (casos) y arterias pudenda externa (controles).

ADN de *C. pneumoniae*

En nuestro estudio se encontró ADN de *C. pneumoniae*, mediante PCR, en 18 placas de ateroma carotídeo (69,23%) y en seis arterias pudendas externas del grupo control (12%). Esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0,0001$; χ^2) (Figura).

Discusión

Este trabajo fue diseñado como un estudio de casos y controles para evaluar el papel de la infección crónica por *C. pneumoniae* en la enfermedad cerebrovascu-

lar (EC). Nuestros hallazgos apoyan el papel de la infección crónica por *C. pneumoniae* en la patogenia de la EC extracranial, sobre la base de que hemos encontrado síntesis de anticuerpos en los pacientes, significativamente superior a la población control, y se ha podido detectar ADN del patógeno de muestras de aterosomas carotídeos.

La comparabilidad de los grupos de sujetos fue difícil de conseguir, a causa de la dificultad para encontrar adultos mayores de 60 años a los que se les pudiera extraer parte de una arteria (la pudenda externa en nuestro caso), durante un procedimiento quirúrgico, sin que esto supusiera un gesto extraordinario.

Se seleccionó a los participantes del grupo control una vez concluido el grupo de casos, para de este modo controlar dos factores de riesgo capitales en la arteriosclerosis, como fue la edad y el sexo. Los pacientes con EC fueron 5 años mayores, como media, que los controles, siendo esta diferencia estadísticamente significativa. Creemos que desde el punto de vista clínico esta diferencia no fue importante por dos motivos: la media de edad fue superior a los 60 años en ambos grupos (65,38 años en los casos y 60,12 años en los controles), y la proporción de mayores de 60 años, en ambos grupos, no muestra diferencia estadística (Tabla I).

Con objeto de ajustar un modelo multivariante explicativo de la presencia o no de *C. pneumoniae*, y dado el tamaño de la muestra, hubo que usar la regresión logística exacta. Aplicando el programa se verificó la bondad del modelo ajustado mediante el test de Hosmer-Lemeshow, que no fue significativo ($p=0,204$; χ^2 con

ocho grados de libertad). Además, se llevó a cabo estudio de outliers y datos de peso sin identificación de alguno de ellos. El único factor que se identificó claramente significativo y muy fuerte fue el efecto de pertenecer al grupo de casos o de controles con una odds ratio de 26,82 (IC al 95% de 6,9 a 104,4). Este valor tan alto de la estimación puntual de la razón de ventajas podría explicarse suponiendo que estamos en presencia de sobrestimación debido al tamaño de la muestra y a la fuerte relación entre los factores de riesgo. El tabaquismo es otro factor que está fuertemente implicado con la patología arteriosclerótica, y en principio este parámetro no se consideró para el ajuste. Pero al efectuar el análisis descubrimos que la exposición al tabaquismo tenía una distribución similar en ambos grupos (Tabla I), evitando un importante sesgo que ya otros autores han referido [16]. Dado que *C. pneumoniae* es un patógeno respiratorio, se ha comprobado su frecuente asociación al tabaquismo; por tanto, cuando se realicen estudios epidemiológicos hay que controlar el tabaquismo como posible variable de confusión. El factor de la obesidad encontramos que está más representado en el grupo control; sin duda, por el tipo de sujetos seleccionados, pacientes de insuficiencia venosa crónica superficial, para los que la obesidad es uno de sus principales factores de riesgo.

Extraer un segmento de arteria pudenda externa durante la cirugía convencional de varices es un gesto mínimo, ya que normalmente esta arteria se puede ligar si se precisa; lo novedoso ha sido extraer un segmento de 1 cm para su análisis. No hubo ninguna complicación en el post-

operatorio de los pacientes intervenidos de varices (grupo control) atribuible a la extracción de una biopsia de arteria pudenda externa.

Hemos realizado la determinación de anticuerpos IgG anti-MOMP y hemos demostrado una alta seroprevalencia en el grupo de enfermos frente al control. Para la IFI se estableció un punto de corte en 1:32, lo suficientemente alto como para evitar errores de especificidad. La técnica de ELISA obvia este problema, consiguiendo valores de seroprevalencia superiores en el grupo de EC e inferiores en el grupo control. Las odds ratio calculadas son las más elevadas de las referidas en la literatura; sólo un trabajo [17] presenta unas cifras aproximadas (7,4) y fue para IgG con umbral de seropositividad en 1:64, para un estudio de casos controles sobre cardiopatía isquémica. No se han reportado en ningún trabajo OR superiores a 10, usando la técnica de ELISA. En la literatura los anticuerpos frente a *C. pneumoniae* han sido ensayados mediante ELISA en sólo 4 trabajos [18-21]; es una técnica aún poco extendida, para determinar anticuerpos frente a *C. pneumoniae*. Hay publicados en la literatura internacional cuatro trabajos seroepidemiológicos de casos controles en los que se ha encontrado asociación entre la seroprevalencia frente a *C. pneumoniae* y EC [22-25]; refieren unas razones de riesgo entre 2 y 4,4. Fagerberg [26] realizó un estudio en 1999 de seguimiento para mostrar si la modificación de títulos serológicos eran un factor de riesgo para ACV. Incluyó a 152 varones con HTA y otro factor de riesgo cardiovascular y se siguieron durante 3,5 años.

Los niveles de IgG e IgA se elevaron en el 55% de los casos que sufrieron ACV. Estos resultados hacían que el aumento en los títulos supusiera un riesgo relativo de 8,58 (IC al 95% de 1,7-6,98). Pero también hay dos estudios prospectivos que refutan los anteriores hallazgos, no encontrando que los niveles elevados de anticuerpos frente a *C. pneumoniae* supongan factor de riesgo alguno [27,28]. Incluso dos estudios de casos y controles anidados en el estudio ARIC divergen en sus conclusiones. El estudio referido a EC [22] encuentra como la seroprevalencia supone una OR de 2,00, y el estudio referido a cardiopatía isquémica no halla tal asociación [29].

Otra parte importante en nuestro estudio fue determinar ADN de *C. pneumoniae*. Hemos encontrado ADN de *C. pneumoniae* en el 69%. En el grupo control la PCR ha sido positiva en el 12%.

La PCR es una técnica altamente específica y permite una alta fiabilidad en el diagnóstico [15,30]. Nosotros hemos aplicado una heminested, de modo que conseguimos una seguridad absoluta de que los fragmentos de ADN que hemos encontrado corresponden al genoma de la *C. pneumoniae*.

Utilizar la arteria pudenda externa como control supone un problema añadido, porque comparamos arterias que normalmente sufren de arteriosclerosis (carótidas) con aquellas que rara vez se afectan (pudenda interna). La arteriosclerosis cerebrovascular tampoco comparte el mismo patrón etiopatogénico que la arteriopatía de miembros inferiores, que es la que afecta a la pudenda. Aun así, la pudenda es una arteria de tipo muscular de

estructura histológica muy similar a la carotida. Creemos en cualquier caso, que la arteria de una persona viva es siempre mejor testigo que las de cadáver, que se han utilizado en la mayoría de los estudios publicados [31,32]. La principal ventaja que nuestra metodología supone es que permite realizar un estudio real de casos y controles desde un triple punto de vista: seroepidemiológico, histológico y clínico.

En la literatura hay referidos 11 trabajos en los que se ha investigado la presencia de *C. pneumoniae* en placas de ateroma carotídeo. En cinco trabajos se ha aplicado la PCR, y sus resultados van desde el 15% al 61% [33-37] de positividad. Hay dos trabajos, que concluyen la no asociación de *C. pneumoniae* con la arteriosclerosis carotídea. En uno no se encuentran trazas de ADN clamidial [32], y en el otro no consideran que la asociación sea significativa por un bajo porcentaje de casos positivos, el 8% [38].

Otra técnica utilizada para la detección de *C. pneumoniae* en las placas es la inmunohistoquímica; con ella se obtienen, en general, altos porcentajes de positividad, del 100% (en sólo cinco placas de ateroma) al 55% [34,39-42]. Sólo hay un trabajo en el que se compara la presencia de *C. pneumoniae* en placas de ateroma carotídeo y arterias sanas, pero del mismo paciente. No se detecta al patógeno en muestras de arteria tiroidea superior [33]. Nosotros no tenemos explicación al hecho de encontrar ADN clamidial en seis arterias control, máxime cuando cuatro de ellos tenían serología negativa (mediante ELISA e IFI). El hecho de encontrar *C. pneumoniae* en tejido vascular no

ateromatoso no es una novedad, y ya se refiere en algunos trabajos [43,44]; además, no se ha llegado a justificar salvo por la existencia de una contaminación en algún punto desde la extracción hasta la realización de la prueba. En todo caso, estaría a favor de una mayor relación entre infección y enfermedad.

En nuestro estudio tampoco se ha conseguido establecer relación entre la seroprevalencia, con cualquiera de las dos técnicas y la detección del ADN clamidial. Son muy pocos los trabajos que encuentran alguna relación y siempre con grupos muestrales mayores al nuestro [45]. Por último, los niveles de fibrinógeno, marcador de inflamación e infección crónica, tampoco ha obtenido los resultados referidos por otros investigadores [46].

Para que la infección sea un factor de riesgo [47-49], independiente de otros como la hiperlipidemia, el tabaquismo, la hipertensión, diabetes o una historia familiar [50] de la enfermedad, será necesario responder a las siguientes preguntas: en primer lugar, cuál es el mecanismo de acción de *C. pneumoniae* para producir arteriosclerosis, y en segundo lugar, si la *C. pneumoniae* causa un daño inicial y desencadena la arteriosclerosis o si lo que hace es acelerar y agravar las lesiones ateromatosas previas.

El mecanismo etiopatogénico es desconocido. La *C. pneumoniae* infecta a los macrófagos alveolares y se distribuye en el organismo utilizando macrófagos y monocitos como vectores [51,52]. La infección crónica macrofágica puede contribuir, iniciar o perpetuar la reacción inflamatoria de las lesiones endoteliales o de las placas de ateroma [11]. En cual-

quier caso sería a través de un mecanismo inmune con degeneración e inflamación, ya que la infección por *C. pneumoniae* induce activación inmunitaria mediada por la liberación de citocinas proinflamatorias (factor de necrosis tumoral α , interleucinas 1, 6 y 8) y expresan la molécula CD14 [53]. El interferón gamma, de los linfocitos Th1 sensibilizados [54], aumenta la dioxigenasa intramonocítica, la cual oxida el triptófano hasta quineurina. Esta sustancia reduce la salida extracelular de *C. pneumoniae* (lo que explica la menor efectividad del cultivo), aumenta la persistencia intracelular, reduce la expresión de MOMP y aumenta la expresión de proteína de shock térmico 60 (HSP-60) [12]. La HSP-60 estimula la síntesis de autoanticuerpos, la activación de los macrófagos para producir más citocinas proinflamatorias y metaloproteína que degrada el colágeno [55]. Este sería uno de

los mecanismos de perpetuación y progresión de las lesiones ateromatosas, concebidas al amparo de la teoría infecciosa de la arteriosclerosis [12,33].

No se puede deducir de nuestro trabajo una relación causal entre la infección crónica por *C. pneumoniae* y la arteriosclerosis carotídea. Sin embargo, la alta seroprevalencia en el grupo de enfermos y la frecuente detección de *C. pneumoniae* viable en las placas de aterosclerosis carotídea, nos hace sospechar que la infección por *C. pneumoniae* desempeña algún papel en la etiopatogenia de la arteriosclerosis. La realización de futuros estudios de casos y controles en los que se estudien tanto los aspectos serológicos como histológicos, en grupos más amplios de pacientes, comparables en todos los aspectos anteriores, conducirá a dilucidar de manera definitiva cómo algunas infecciones crónicas pueden inducir arteriosclerosis.

Bibliografía

1. Osler W. Diseases of the arteries. In Osler W, ed. Modern medicine: its practice and theory. Philadelphia, PA: Lea & Febigen; 1908. p. 429-47.
2. Fabricant CG. Atherosclerosis: the consequence of infection with a herpes virus. Adv Vet Sci Comp Med 1985; 30: 39-66.
3. Syrj  nen J, Valtonen VV, Livanainen M, Kaste M, Huttunen JK. Preceding infection as an important risk factor for ischaemic brain infarction in young and middle aged patients. Br Med J 1988; 296: 1156-60.
4. Blasi F, Denti F, Erba M, Cosentini R, Raccanelli R, Rinaldi A, et al. Detection of *Chlamydia pneumoniae* but not *Helicobacter pylori* in atherosclerotic plaques of aortic aneurysms. J Clin Microbiol 1996; 34: 2766-9.
5. Saikku P, Leinonen M, Mattila K, Ekman MR, Nieminen MS, M  kel   PH, Huttunen JK, Valtonen V. Serologic evidence of an association of a novel *Chlamydia*, TWAR, with chronic coronary heart disease and acute myocardial infarction. Lancet 1988; 11: 983-6.
6. Thom DH, Wang S-P, Grayston JT, Siscovick DS, Stewart DK, Kronmal RA, et al. *Chlamydia pneumoniae* strain TWAR antibody and angiographically demonstrated coronary artery disease. Arterioscler Thromb 1991; 11: 547-51.
7. Saikku P, Leinonen M, Tenkanen L, Linnanm  ki E, Ekman M-R, Manninen V, et al. Chronic *Chlamydia pneumoniae* infection as a risk factor for coronary heart disease in the Helsinki Heart Study. Ann Intern Med 1992; 116: 273-8.
8. Leinonen M, Linnanmaki, Mattila K, Nieminen MS, Valtonen V, Leirisalonen M, Saikku P. Circulating immune complexes containing chlamydial lipopolysaccharide in acute myocardial infarction. Microb Pathogen 1990; 9: 67-73.

9. Shor A, Kuo CC, Patton DL. Detection of *Chlamydia pneumoniae* in coronary arterial fatty streaks and atheromatous plaques. *S Afr Med J* 1992; 82: 158-61.
10. Wong YK, Gallagher PJ, Ward ME. *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis. *Heart* 1999; 81: 232-8.
11. Gupta S, Leatham E. The relation between *C. pneumoniae* and atherosclerosis. *Heart* 1997; 77: 7-8.
12. Gutiérrez J, Linares-Palomino J, Rodríguez M, Maroto MC. *Chlamydia pneumoniae* y su relación con la arteriosclerosis humana. *Rev Invest Clin* 2000; 52: 482-6.
13. North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial (NASCET). *N Engl J Med* 1991; 226: 3289-94.
14. Asymptomatic Carotid Atherosclerotic Study (ACAS). *JAMA* 1995; 273: 1421-8.
15. Campbell LA, Pérez-Melgosa M, Hamilton D, Kuo CC, Grayston JT. Detection of *C. pneumoniae* by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 434-9.
16. Hahn DL, Golubjatnikov R. Smoking is a potential confounder of the *C. pneumoniae* coronary artery disease association. *Arterioscler Thromb* 1992; 12: 945-7.
17. Mendall MA, Carrington D, Strachan D, Patel P, Molineaux N, Levy J, et al. *C. pneumoniae*: risk factors for seropositivity and association with coronary heart disease. *J Infect* 1995; 30: 121-8.
18. Mazzoli S, Tofani N, Fantini A, Semplici F, Bandini F, Salvi A, Vergassola R. *Chlamydia pneumoniae* antibody response in patients with acute myocardial infarction and their follow-up. *Am Heart J* 1998; 135: 15-20.
19. Ossewaarde JM, Feskens EJ, De Vries A, Valinga CE, Kromhout D. *Chlamydia pneumoniae* is a risk factor for coronary heart disease in symptom-free elderly men, but *Helicobacter pylori* and cytomegalovirus are not. *Epidemiol Infect* 1998; 120: 93-9.
20. Tiran A, Tio RA, Ossewaarde JM, Tiran B, Den Heijer P, The TH, Wilders-Truschning MM. Coronary angioplasty induces rise in *Chlamydia pneumoniae*-specific antibodies. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1013-7.
21. Korner I, Blatz R, Wittig I, Pfeiffer D, Ruhlmann C. Serological evidence of *Chlamydia pneumoniae* lipopolysaccharide antibodies in atherosclerosis of various vascular regions. *Vasa* 1999; 28: 259-63.
22. Melnick SL, Shahar E, Folsom AR, Grayston JT, Sorlie PD, Wang SP, Szklo M. Past infection by *Chlamydia pneumoniae* strain TWAR and asymptomatic carotid atherosclerosis. Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study Investigators. *Am J Med* 1993; 95: 499-504.
23. Wimmer ML, Sandmann-Strupp R, Saikku P, Haberl RL. Association of chlamydial infection with cerebrovascular disease. *Stroke* 1996; 27: 2207-10.
24. Cook PJ, Honeybourne D, Lip GY, Beevers DG, Wise R, Davies P. *Chlamydia pneumoniae* antibody titers are significantly associated with acute stroke and transient cerebral ischemia: the West Birmingham Stroke Project. *Stroke* 1998; 29: 404-10.
25. Esposito G, Blasi F, Allegra L, Chiesa R, Melissano G, Cosentini R, et al. Demonstration of viable *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerotic plaques of carotid arteries by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Ann Vasc Surg* 1999; 13: 421-5.
26. Fagerberg B, Gnarpe J, Gnarpe H, Agewall S, Wikstrand J. *Chlamydia pneumoniae* but not cytomegalovirus antibodies are associated with future risk of stroke and cardiovascular disease: a prospective study in middle-aged to elderly men with treated hypertension. *Stroke* 1999; 30: 299-305.
27. Markus HS, Sitzer M, Carrington D, Mendall MA, Steinmetz H. *Chlamydia pneumoniae* infection and early asymptomatic carotid atherosclerosis. *Circulation* 1999; 100: 832-7.
28. Coles KA, Plant AJ, Riley TV, Smith DW, McQuillan BM, Thompson PL. Lack of association between seropositivity to *Chlamydia pneumoniae* and carotid atherosclerosis. *Am J Cardiol* 1999; 84: 825-8.
29. Nieto FJ, Folsom AR, Sorlie PD, Grayston JT, Wang SP, Chambless LE. *Chlamydia pneumoniae* infection and incident coronary heart disease: the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Am J Epidemiol* 1999; 150: 149-56.
30. Maass M, Bartels C, Engel P, Mamat U, Sievers HH. Endovascular presence of viable *C. pneumoniae* is a common phenomenon in coronary artery disease. *JACC* 1998; 31: 827-32.
31. Chiu B, Viira E, Tucker W, Fong IW. *Chlamydia pneumoniae*, cytomegalovirus, and herpes simplex virus in atherosclerosis of the carotid artery. *Circulation* 1997; 96: 2177-48.
32. Paterson DL, Hall J, Rasmussen SJ, Timms P. Failure to detect *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerotic plaques of Australian patients. *Pathology* 1998; 30: 169-72.
33. Ross R. Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340: 115-26.
34. Grayston JT, Kuo CC, Coulson AS, Campbell LA, Lawrence RD, Lee MJ, Strandness ED, Wang SP. *Chlamydia pneumoniae* (TWAR) in

- atherosclerosis of the carotid artery. *Circulation* 1995; 92: 3397-400.
35. Maass M, Krause E, Engel PM, Kruger S. Endovascular presence of *Chlamydia pneumoniae* in patients with hemodynamically effective carotid artery stenosis. *Angiology* 1997; 48: 699-706.
36. Maass M, Bartels C, Kruger S, Krause E, Engel PM, Dalhoff K. Endovascular presence of *Chlamydia pneumoniae* DNA is a generalized phenomenon in atherosclerotic vascular disease. *Atherosclerosis* 1998; 140 (Suppl 1): S25-30.
37. Nadrchal R, Makristathis A, Apfalter P, Rotter M, Trubel W, Huk I, et al. Detection of *Chlamydia pneumoniae* DNA in atheromatous tissues by polymerase chain reaction. *Wien Klin Wochenschr* 1999; 26: 153-6.
38. Jantos CA, Nessler A, Waas W, Baumgartner W, Tillmanns H, Haberbosch W. Low prevalence of *Chlamydia pneumoniae* in atherectomy specimens from patients with coronary heart disease. *Clin Infect Dis* 1999; 28: 988-92.
39. Yamashita K, Ouchi K, Shirai M, Gondo T, Nakazawa T, Ito H. Distribution of *Chlamydia pneumoniae* infection in the atherosclerotic carotid artery. *Stroke* 1998; 29: 773-8.
40. Chiu B. Multiple infections in carotid atherosclerotic plaques. *Am Heart J* 1999; 138: S534-6.
41. Mosorin M, Surcel HM, Laurila A, Lehtinen M, Karttunen R, Juvonen J, et al. Detection of *Chlamydia pneumoniae*-reactive T lymphocytes in human atherosclerotic plaques of carotid artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 1061-7.
42. Yamashita K, Ouchi K, Shirai M, Gondo T, Nakazawa T, Ito H. Distribution of *Chlamydia pneumoniae* infection in the atherosclerotic carotid artery. *Stroke* 1998; 29: 773-8.
43. Ong G, Thomas BJ, Mansfield AO, Davidson BR, Taylor-Robinson D. Detection and widespread distribution of *Chlamydia pneumoniae* in the vascular system and its possible implications. *J Clin Pathol* 1996; 49: 102-6.
44. Jackson LA, Campbell LA, Schmidt RA, Kuo CC, Cappuccio AL, Lee MJ, Grayston JT. Specificity of detection of *Chlamydia pneumoniae* in cardiovascular atheroma: evaluation of the innocent bystander hypothesis. *Am J Pathol* 1997; 150: 1785-90.
45. Maass M, Gieffers J, Krause E, Engel PM, Bartels C, Solbach W. Poor correlation between microimmunofluorescence serology and polymerase chain reaction for detection of vascular *Chlamydia pneumoniae* infection in coronary artery disease patients. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 1998; 187: 103-6.
46. Patel P, Mendall MA, Carrington D, Strachan DP, Leatham E, Molineaux N, et al. Association of *Helicobacter pylori* and *Chlamydia pneumoniae* infections with coronary heart disease and cardiovascular risk factors. *Br Med J* 1995; 311: 711-4.
47. Jackson LA, Campbell LA, Kuo CC, Lee A, Grayston JT. Isolation of *Chlamydia pneumoniae* from a carotid endarterectomy specimen. *J Infect Dis* 1997; 176: 292-5.
48. Kaukoranta-Rolvanen SS, Ronni T, Leinonen M, Saikku P, Laitinen K. Expression of adhesion molecules on endothelial cells stimulated by *Chlamydia pneumoniae*. *Microb Pathog* 1996; 21: 407-11.
49. Laitinen K, Laurila AL, Leinonen M, Saikku P. Reactivation of *Chlamydia pneumoniae* infection in mice by cortisone treatment. *Infect Immunol* 1996; 64: 1488-90.
50. Mazzoli S, Tofani N, Fantini A, Semplici F, Bandini F, Salvi A, Vergassola R. *Chlamydia pneumoniae* antibody response in patients with acute myocardial infarction and their follow-up. *Am Heart J* 1998; 135: 15-20.
51. Gaydos CA, Summersgill JT, Sahney NN, Ramírez JA, Quinn TC. Replication of *Chlamydia pneumoniae* in vitro in human macrophages, endothelial cells and aortic artery smooth muscle cells. *Infect Immunol* 1996; 64: 1614-20.
52. Molestina RE, Miller RD, Ramírez JA, Summersgill JT. Infection of human endothelial cells with *Chlamydia pneumoniae* stimulates transendothelial migration of neutrophils and monocytes. *Infect Immunol* 1999; 67: 1323-30.
53. De Caterina R, Libby P, Peng HB. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest* 1995; 96: 60-8.
54. Helme S, Juvonen T, Laurila A, Juvonen J, Mosotin M, Saikku P, Surcel HM. *Chlamydia pneumoniae* reactive T lymphocytes in the walls of abdominal aortic aneurysms. *Eur J Clin Invest* 1999; 29: 546-52.
55. Kol A, Bourcier T, Lichtman AH, Libby P. Chlamydial and human heat shock protein 60s activate human vascular endothelium, smooth muscle cells, and macrophages. *J Clin Invest* 1999; 103: 571-7.

CHLAMYDIA PNEUMONIAE Y ENFERMEDAD CEREBROVASCULAR

Resumen. Introducción. La Chlamydia pneumoniae se ha relacionado con la enfermedad arteriosclerótica extracraneal, tanto por estudios seroepidemiológicos como histológicos. Realizamos un estudio de casos y controles para determinar la seroprevalencia de infección crónica por C. pneumoniae, y la detección de la bacteria en biopsias arteriales. Pacientes y métodos. El grupo de casos estuvo formado por 26 pacientes con estenosis carotídea subsidiaria de tratamiento quirúrgico. Los controles fueron 50 individuos sometidos a cirugía de varices. Se ajustaron los grupos por edad, sexo y tabaquismo. De ambos grupos se obtuvieron muestras serológicas, donde se determinaron anticuerpos IgG frente a MOMP de C. pneumoniae por microinmunofluorescencia y ELISA. Se obtuvo biopsia arterial en los casos de placa de ateroma carotídeo y en los controles de la arteria pudenda externa. Sobre las biopsias se realizó reacción en cadena de polimerasa utilizando los primers: HL-1, HM-1 y HR-1. Semidió el nivel de fibrinógeno como marcador de inflamación crónica. Resultados. La seroprevalencia de infección crónica por C. pneumoniae por microinmunofluorescencia para IgG > 1:32 fue: 69,23% en casos y 24% en controles (OR: 7,12; IC al 95%: 2,47-20,48). Por ELISA la seroprevalencia fue: 76,92 en casos y 16% en controles (OR: 17,5; IC al 95%: 5,35-57,23). El ADN de C. pneumoniae se detectó en 18 casos (69,23%) y en 6 controles (12%) ($p < 0,0001$, ji al cuadrado). No se pudo establecer correlación entre los resultados serológicos e histológicos. Los niveles de fibrinógeno no mostraron diferencias entre los grupos. Conclusión. Nuestros resultados apoyan la hipótesis sobre la participación de C. pneumoniae en la etiopatogenia de la arteriosclerosis cerebral extracraneal. [ANGIOLOGÍA 2001; 53: 72-83]

Palabras clave. Anticuerpo. Aterosclerosis. Chlamydia pneumoniae. Estenosis carotídea. Estudio de casos y controles. Reacción en cadena de la polimerasa.

CHLAMYDIA PNEUMONIAE E DOENÇA VASCULAR CEREBRAL

Resumo. Introdução. A Chlamydia pneumoniae foi associada à doença arteriosclerótica extra-craniana, tanto por estudos seroepidemiológicos como histológicos. Realizamos um estudo de caso controle, para determinar a seroprevalência de infecção crônica por C. pneumoniae, e detectar a bactéria em biopsias arteriais. Doentes e métodos. O grupo de casos era formado por 26 doentes com estenose carotídea necessitando tratamento cirúrgico. O grupo de controle era constituído de 50 indivíduos submetidos a cirurgia varicosa. Os grupos foram determinados por idade, sexo e tabagismo. De ambos os grupos obtiveram-se amostras serológicas a partir das quais se determinaram os anticorpos IgG contra a MOMP da C. pneumoniae por microinmunofluorescência e ELISA. Obteve-se biopsia arterial de placa de ateroma carotídeo, nos casos e nos controles, da artéria pudenda externa. Nas biopsias realizou-se a reação de polimerase em cadeia, utilizando os primers: HL-1, HM-1 e HR-1. Utilizou-se o nível de fibrinogênio, como marcador de inflamação crônica. Resultados. A seroprevalência de infecção crônica por C. pneumoniae por microinmunofluorescência para IgG > 1:32 foi: 69,23% nos casos e 24% nos controles (OR: 7,12; IC a 95%: 2,47-20,48). Por ELISA, a seroprevalência foi: 76,92 nos casos e de 16% nos controles (OR: 17,5; IC a 95%: 5,35-57,23). O ADN da C. pneumoniae foi detectado em 18 casos (69,23%) e em 6 controles (12%) ($p < 0,0001$ Chi quadrado). Não foi possível estabelecer uma correlação entre os resultados serológicos e histológicos. Os níveis de fibrinogênio não evidenciaram diferenças entre os grupos. Conclusão. Os nossos resultados apoiam a hipótese da participação de C. pneumoniae na etiopatogênese da arteriosclerose cerebral extra-craniana. [ANGIOLOGÍA 2001; 53: 72-83]

Palavras chave. Anticorpo. Aterosclerose. Chlamydia pneumoniae. Ensaios caso-controle. Estenose carotídea. Reação de polimerase em cadeia.