

Efectos *in vitro* de la infección por *Chlamydia pneumoniae* en células implicadas en el proceso aterogénico

J. Millán Núñez-Cortés^a, Y. Álvarez Rodríguez^b, G. Álvarez Noves^b, F.J. Torres Segovia^a
y L. Álvarez-Sala Walter^a

^aServicio de Medicina Interna (III). Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid.

^bLaboratorio de Investigación Biomédica (Cantoblanco). Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid. España.

Fundamentos. Estudios experimentales indican los posibles efectos patogénicos de las infecciones en la pared vascular, y se ha reconocido que intervienen en distintos fenómenos que acompañan a la formación de la placa de ateroma.

Objetivo. Evaluar las características morfodinámicas de diferentes células humanas normales de la pared vascular, antes y después de infectarlas con *Chlamydia pneumoniae* (CP).

Material y métodos. Cultivos de células epiteliales, monocitos y linfocitos humanos de sangre periférica, células endoteliales, fibroblastos y células musculares lisas, inoculados con una cepa de CP homologada. Se han utilizado técnicas de videointervalometría y de microscopía digital en contraste de fases, para valorar las características morfodinámicas celulares, y la inmunofluorescencia para la detección de CP.

Resultados. En las células epiteliales, la infección por CP provoca dos tipos de degeneración: una precoz (a las 8 h) y rápida (dura 1-2 h), y otro tipo de degeneración celular más tardía (a las 16 h) y más lenta (dura unas 20 h). La actividad mitótica se reduce en los primeros días, para recuperarse al cabo de 5-6 días y normalizarse al noveno. En los cultivos monocitarios, la CP provoca un tipo de degeneración celular con vacuolización (vacuolas con cuerpos de inclusión).

La máxima tasa de degeneración se obtiene a la semana, excepto en los linfocitos, que es más rápida. Cuando las células endoteliales infectadas con CP mueren forman agregados, con una primera cinética rápida y una segunda más lenta. Se produce un descenso en su actividad mitótica, seguido de un incremento a los pocos días. Los fibroblastos exhiben una elevada tasa de degeneración próxima al 20%. No se forman agregados de células degeneradas. Las células musculares lisas se trasforman en células espumosas bajo el influjo de la infección con CP.

Conclusiones. El hecho de que todas las células sean susceptibles de degenerar y de sufrir transformaciones obliga a pensar que la infección puede iniciar el fenómeno de disfunción endotelial, mantener el componente inflamatorio crónico en la pared y provocar la inestabilidad de las placas ateromatosas.

Palabras clave:

Chlamydia pneumoniae. Cultivo celular. Toxicidad *in vitro*.

IN VITRO EFFECTS OF CHLAMYDIA PNEUMONIAE INFECTION IN CELLS IMPLICATED IN THE ATHEROGENIC PROCESS

Background. Experimental studies indicate the possible pathogenic effects of vascular wall infections and recognize that they play a role in the various phenomena accompanying the formation of atherosomatous plaque.

Objective. To evaluate the morphodynamic characteristics of different types of normal human

Trabajo realizado con ayudas a proyectos de investigación: Comunidad de Madrid 08.4/0030/98.
Comunidad de Madrid 08.2/0008/2001.

Correspondencia: J. Millán Núñez-Cortés.
Servicio de Medicina Interna III. HGU Gregorio Marañón.
Dr. Esquerdo, 46. 28007 Madrid. España.
Correo electrónico: jmillan@hggm.es

cells of the vascular wall before and after infection with *Chlamydia pneumoniae* (CP).

Material and methods. Cultures of human epithelial cells, monocytes and lymphocytes from peripheral blood, endothelial cells, fibroblasts and smooth muscle cells were inoculated with a standardized CP strain. The techniques of video intervalometry and phase contrast digital microscopy were used to evaluate the morphodynamic characteristics of the cells and immunofluorescence was used to detect CP.

Results. In epithelial cells, CP infection provoked two types of degeneration: early (at 8 hours) and rapid (lasting 1-2 hours). The other type of cellular degeneration occurred later (at 16 hours) and was slower (lasting approximately 20 hours). Mitotic activity decreased in the first few days, recovering after 5-6 days and returning to normal on the ninth day. In monocyte cultures, CP provoked a type of cellular degeneration with vacuolization (vacuoles with inclusion bodies). The maximum rate of degeneration was obtained after 1 week, except in lymphocytes, where degeneration was more rapid. Endothelial cells infected with CP formed aggregates when they died, showing rapid first kinetics and slow second kinetics. Mitotic activity decreased and then increased a few days later. Fibroblasts showed a high rate (nearly 20%) of degeneration.

Degenerated cells did not form aggregates.

Smooth muscle cells transformed into foam cells under the influence of CP infection.

Conclusions. The finding that all the cells were susceptible to degeneration and transformation indicates that infection may initiate a phenomenon of endothelial dysfunction, maintaining the chronic inflammatory component in the wall, and provoking instability of atherosomatous plaques.

Key words:

Chlamydia pneumoniae. Cell culture. *In vitro* toxicity.

Introducción

El concepto de arteriosclerosis como fenómeno inflamatorio crónico ha sido reafirmado en los últimos años gracias, sobre todo, al desarrollo de la teoría lesional, protagonizada y defendida por Ross^{1,2}, y al mayor y mejor conocimiento de los diferentes elementos patogénicos que conducen a la formación de la placa de ateroma. Además, la teoría infecciosa de la arteriosclerosis es motivo de interés en el momento actual, por dos razones fundamen-

tales: el propio desarrollo del concepto inflamatorio de la arteriosclerosis, y los hallazgos que han ligado la enfermedad cardiovascular a la infección por *Chlamydia pneumoniae* (CP)³.

Sin embargo, aún necesitamos conocer mejor los mecanismos por los que la CP puede promover la arteriosclerosis. En este sentido, los estudios en cultivos celulares han posibilitado el aislamiento, la multiplicación y el estudio de estos microorganismos intracelulares. La posibilidad de infectar distintos tipos celulares *in vitro*⁴ ha permitido el estudio de las alteraciones que produce la CP a nivel de la expresión de citocinas^{5,6}, de las modificaciones del metabolismo de las lipoproteínas^{7,8}, del estímulo de la formación de células espumosas⁹, o de las alteraciones en el tropismo y la movilidad celular¹⁰.

Nuestro interés se ha centrado en el estudio de las características morfodinámicas de diferentes células humanas normales de la pared vascular, antes y después de infectarlas con CP. Adicionalmente, el trabajo nos debe permitir disponer de un modelo para el estudio de la infección por CP en el que podamos evaluar aspectos tan significativos de la interrelación CP-célula como son la movilidad, la adhesividad y la proliferación celular, así como los procesos de degeneración y de muerte celular.

Material y métodos

Los estudios se han realizado sobre cultivos de células epiteliales, monocitos y linfocitos humanos de sangre periférica, células endoteliales, fibroblastos y células musculares lisas de aorta. Las estirpes celulares se han obtenido de la ECCC (European Collection of Cell Cultures). Los lotes obtenidos, así como los viales procedentes de cultivos secundarios, se almacenan a -80 °C:

1. Células epiteliales para el mantenimiento de CP (células HEp-2). Las células se subcultivan cada 7 días siguiendo el procedimiento general.

2. Células humanas de endotelio vascular (HMEC-1). Se mantienen en medio MCDB-131 con glutamina, factor de crecimiento epidérmico (EGF), hidrocortisona, penicilina, estreptomicina, fungizona y suero bovino fetal al 20%.

3. Monocitos humanos de sangre periférica. Proceden de muestras de sangre recogidas con EDTA-Na, centrifugadas a 125 g durante 15 min a temperatura ambiente. El sedimento (con las células) se ajusta al volumen inicial con salina sin iones Ca ni Mg. Se purifican por centrifugación (15 min a 800 g) sobre polisucrosa y diatrizoato sódico ajustado a densidad 1,077 mg/ml utilizando el sistema Accuspin.

4. Fibroblastos (FA). Se obtuvieron a partir de un cultivo primario de amígdalas normales de una niña de 5 años. La suspensión celular, obtenida por digestión con tripsina, se lavó sucesivamente, se centrifugó (10 min a 125 g a temperatura ambiente) y para su suspensión se utilizó medio R5a de Iwakata suplementado con suero bovino fetal, penicilina, estreptomicina, gentamicina y nistatina.

5. Células musculares lisas de aorta (T/GHA-VSMC). Las células se adaptaron a crecer en medio R5a de Iwakata, suplementado con bicarbonato, arginina, hidrocortisona, insulina, transferrina, selenito sódico, EGF, L-glutamina, suero de ternera, penicilina y estreptomicina.

Se ha elegido una cepa de CP, homologada en la ATCC (American Type Culture Collection), con la designación de VR 1360. El germen se mantiene en células humanas HEp-2. Tales células se inoculan manteniéndolas en medio Ra5 completo suplementado con glucosa al 27% y cicloheximida, 1 µg/ml. Las células se siembran en tubos de Shell, se distribuye 1 ml de suspensión con las células HEp-2 y se inocula cada tubo con 200 µl de la suspensión de CP. A los 3 días de la inoculación las células inoculadas se resuspenden, y la suspensión así obtenida puede utilizarse para nuevas inoculaciones, ajustando el volumen final necesario.

Estudios de inmunofluorescencia

Para preparar el estudio con inmunofluorescencia se dispone de los tubos Shell sembrados con HEp-2. Los tubos de controles negativos se inoculan con 0,2 ml de medio de inoculación, mientras que los tubos de controles positivos se inoculan con 0,2 ml de inóculo del pase a ensayar. El medio de inoculación y el inóculo se dejan actuar durante 1 h; posteriormente se centrifugan (1 h a 125 g y temperatura ambiente) y a los 3 días de la inoculación se procede a la tinción y a la valoración por inmunofluorescencia. Se utiliza anticuerpo monoclonal frente a CP diluido en una solución tampón fosfato con seroalbúmina bovina y azida sódico, y anticuerpo anti-inmunoglobulina IgG de ratón conjugado con isotiocianato de fluoresceína, diluido en una solución tampón con fosfatos, seroalbúmina bovina, azida sódico y azul de Evans como contracolorante.

La visualización de inclusiones fluorescentes verde manzana y aspecto característico indica un resultado positivo.

Técnicas para la identificación y estudio de células en apoptosis

En el estudio morfológico cuantitativo no dinámico se han utilizado las siguientes técnicas: tinción de Giemsa, marcado con fluoresceína con naranja de acridina/bromuro de etidio, o marcado fluorescente de ADN con DAPI. La solución de naranja de acridina tiñe células vivas y muertas. La de bromuro de etidio sólo tiñe las células que han perdido la integridad de su membrana. Las células vivas se tiñen uniformemente en verde, las células en apoptosis precoz se tiñen en verde y contienen manchas brillantes intranucleares que corresponden a los bloques de cromatina del ADN fragmentado. Las células en apoptosis tardía incorporan también el bromuro de etidio y se tiñen en naranja, y en sus núcleos se pueden observar zonas densas del mismo color que corresponden, asimismo, a los bloques de cromatina del ADN fragmentado. Las células necróticas se tiñen también en naranja, pero sus núcleos están enteros y exhiben una coloración uniforme. El marcado fluorescente de ADN con DAPI (4',6'-diamina-2 fenilindol) provoca un marcado azul del ADN, y se observan núcleos enteros homogéneos en las células vivas o muertas por necrosis, así como fragmentos nucleares en las células apoptóticas.

Técnicas de videointervalometría y microscopía digital de intervalos

Estos procedimientos se utilizan para el estudio de las características morfodinámicas de las células control y de las

inoculadas con CP. La posibilidad de utilizar iluminación diafásica o episcópica facilita la precisa localización de la zona de estudio. Los equipos llevan incorporada una cámara de incubación, por lo que se puede mantener la temperatura con gran precisión. Se utiliza óptica de contraste de fases con condensador de larga distancia focal. Los microscopios permiten utilizar dos salidas de recogida de imagen: en una de ellas se adapta la cámara de fotografía, y en la otra, la cámara de cine o de vídeo. El magnetoscopio utilizado ha sido un modelo Panasonic, y para el registro digital se ha utilizado el programa informático Miro. Se procura establecer las mismas condiciones de filmación para todos los cultivos. La cadencia de registro de imagen se programa en función de la duración del fenómeno a estudiar, y se utilizan aceleraciones comprendidas entre 4 imágenes por segundo y una imagen cada 8 min, lo que, con la máxima aceleración, permite visionar en un minuto los fenómenos que se producen en 3 días.

Resultados

Infección de células epiteliales por CP

En las células epiteliales HEp-2 la infección por CP induce dos tipos de procesos degenerativos.

El primer tipo de degeneración es más precoz; la primera célula muere a las 8 h de la inoculación, y el número máximo de células degeneran entre las 8 y las 24 h. En total, las células degeneradas representan un 10% aproximadamente de las células vivas acumuladas. Las células tardan en morir, aproximadamente, unos 55 min (20-120 min). En este tipo de degeneración, las células pierden refringencia y experimentan vesiculación y rotura de la membrana citoplasmática.

El segundo tipo de degeneración es más tardío. La primera célula muere a las 16 h y continúan degenerando durante más de 8 días. El número de células degeneradas de esta manera representa, entre el sexto y el octavo día, un 8% de las células totales.

Las células tardan en morir una media de 20 h (15-27 h). Las células se desprenden, se ponen refringentes, exhiben movimientos zeióticos y se llenan de vacuolas que contienen abundantes cuerpos de inclusión (fig. 1).

La actividad mitótica de las células disminuye en los 3 primeros días tras la inoculación, pero se recupera y alcanza un ritmo mayor que los controles a partir del sexto día. Al cabo de 8-9 días, el aspecto de los cultivos es similar al de los controles sin inocular.

Hemos podido evidenciar claramente inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales en las células inoculadas a los 3 días de la inoculación, en relación con los controles (fig. 2).

Efectos de la CP en mononucleares

En los monocitos inoculados con CP, algunas células degeneran con el patrón primero de los



Figura 1. Efectos de *Chlamydia pneumoniae* en las células epiteliales HEp2.

descritos para las epiteliales. La primera célula lo hace a las 10 h de la inoculación. Suelen tardar en morir una media de 3 h (40 min-4 h). La máxima degeneración se comprueba al sexto día, y el porcentaje de células muertas puede alcanzar el 10%. Algunas células se retraen y liberan pequeñas vesículas. En la mayoría se observa una reducción de la superficie de contacto y modificaciones en su movimiento. Hemos observado que a los 3 meses los cultivos monocitarios se comportan normalmente y presentan un aspecto normal. Sin embargo, algunas de los monocitos supervivientes reaccionan positivamente con anticuerpos anti-clamidia.

Algunos linfocitos degeneran poco después de la infección con CP. El primero lo hace a las 4 h. Otros linfocitos lo hacen más tarde, a los pocos minutos de establecer contacto con monocitos infectados que van a degenerar. La muerte de la célula linfocitaria se produce con retracción y lisis en el término medio de 45 min. La supervivencia de los linfocitos procedentes de cultivos inoculados es similar a la de los que proceden de cultivos sin inocular.

Efectos de la CP en células endoteliales

En las células endoteliales HMEC-1 inoculadas con CP se observa una onda de degeneraciones entre las 28 y 37 h, que llega a afectar a un 7% de las células. La muerte celular es parecida a la descrita como segundo tipo en las células epiteliales, pero más rápida. De hecho, suele durar, por término medio, unos 68 min (40-82 min). Posteriormente, la tasa de degeneración disminuye gradualmente y las células tardan más en morir; aproximadamente unas 3 h (70 min-10 h). Las células muertas forman agregados (fig. 3). Las que sobreviven llegan a recuperar el aspecto de los cultivos sin inocular.

Tras la inoculación se observa una inhibición de la actividad mitótica, seguida de un aumento moderado de dicha actividad, a partir del sexto día.

Hemos comprobado que la adherencia de células linfomonocitarias al endotelio aumenta notablemente después de la infección de las células HMEC-1 con el agente infeccioso.

Efectos de la CP en fibroblastos

En los fibroblastos (FA) con CP, entre las 24 y las 96 h se observa una onda de degeneraciones que

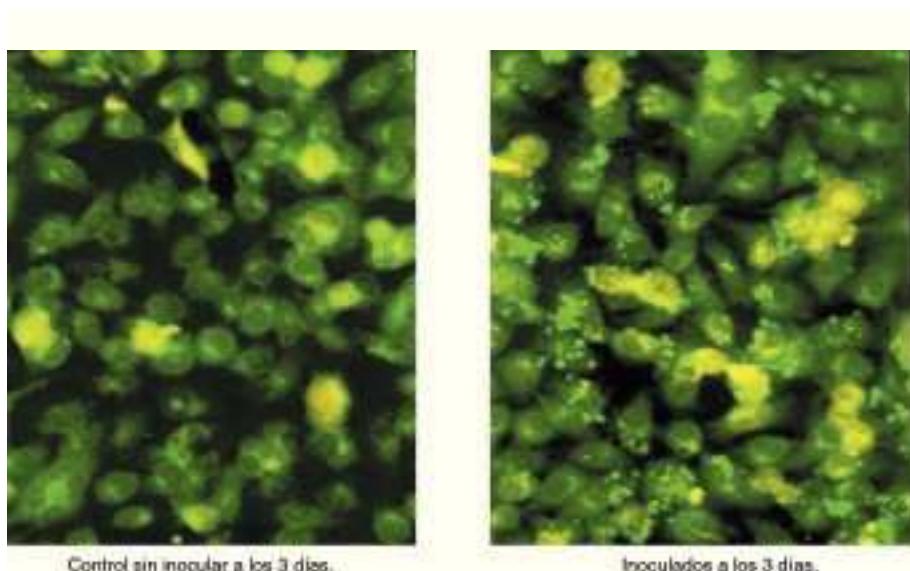


Figura 2. Inmunofluorescencia frente a *Chlamydia pneumoniae* en las células epiteliales HEp2.

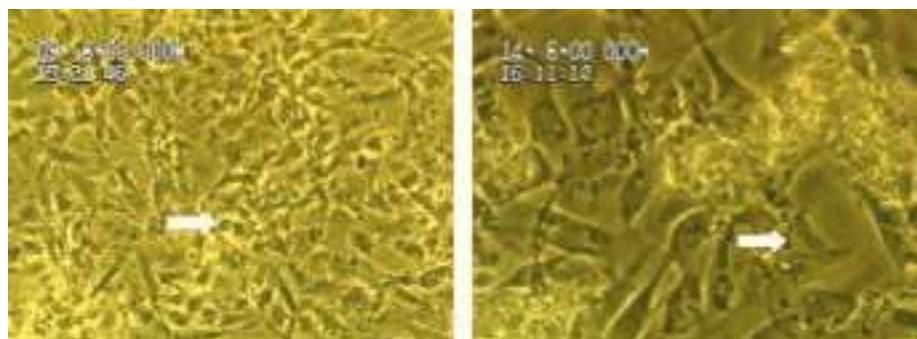


Figura 3. Efectos de *Chlamydia pneumoniae* en las células endoteliales HMEC-1.

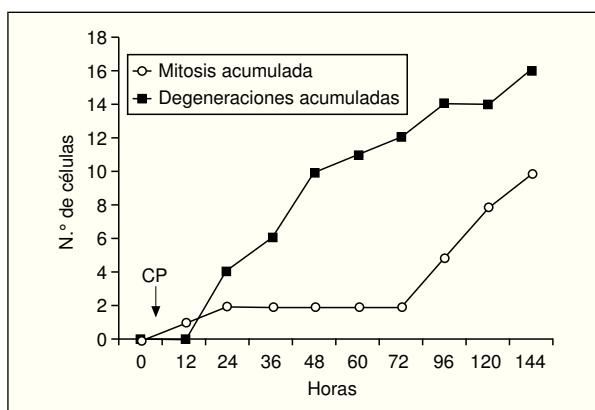


Figura 4. Efectos de *Chlamydia pneumoniae* (CP) en los fibroblastos (mitosis y degeneraciones).

afecta a un 20% de las células, por lo que el campo queda sensiblemente desprovisto de trama celular. La muerte se produce con desprendimiento, retracción y pérdida de volumen. La primera muerte se produce a las 24 h de la inoculación, y el proceso tarda unas 6 h por término medio (3-25 h). Posteriormente, la tasa de degeneración disminuye

gradualmente. Las células muertas no forman agregados.

Tras la inoculación, también se observa una inhibición de la actividad mitótica seguida de un acusado aumento de dicha actividad a partir del tercer día (fig. 4), de tal suerte que al quinto día las células recuperan el aspecto de los cultivos sin inocular.

El movimiento celular es muy intenso bajo el influjo de la infección con CP. Así, a partir de las 48 h, el porcentaje de células en movimiento se incrementa llamativamente, así como la velocidad de las células fibroblásticas en movimiento (fig. 5 A y B).

Efectos de la CP en células musculares lisas

Los efectos de la CP en células musculares lisas de aorta (T/GHA-VSMC) se traducen en una degeneración y muerte celular cuya fase más álgida se produce a las 60 h tras la inoculación. Es, por tanto, una degeneración tardía con respecto a otras estirpes celulares y, además, se mantiene más tiempo.

A los 2 días de la inoculación se produce una inhibición de la actividad mitótica, que se mantiene

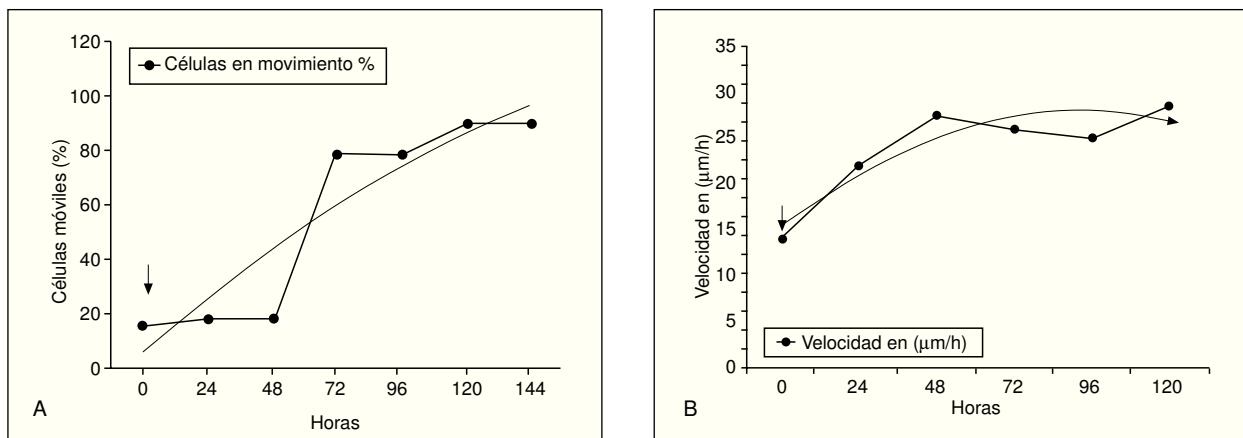


Figura 5. Movilidad de los fibroblastos inducida por *Chlamydia pneumoniae*. A) porcentaje de células; B) velocidad.

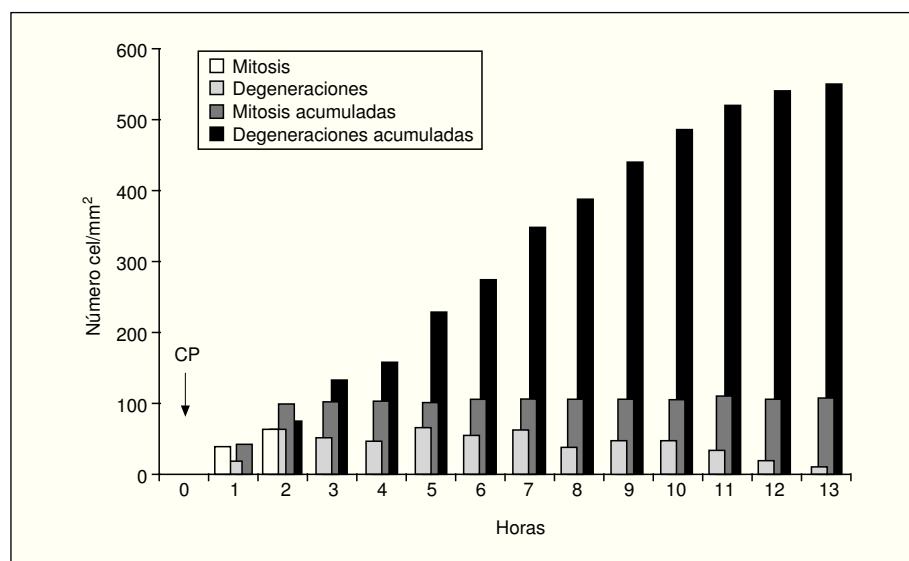


Figura 6. Mitosis y degeneraciones de células musculares lisas (T/GHA-VSMC) inducidas por *Chlamydia pneumoniae*.

de forma más duradera que en el resto de las estirpes celulares. Asimismo, la tasa de degeneración es escasa, pero se mantiene de manera más prolongada que en otros grupos celulares estudiados (fig. 6).

La movilidad celular se afecta en el sentido de que la velocidad de movimientos se incrementa a las 24 h de la inoculación, y disminuye considerablemente a las 48 h de la misma.

Precozmente, a las 20 h de la inoculación, y de manera muy llamativa a las 24 h, se desarrollan células espumosas (fig. 7). La formación de células espumosas sigue un perfil paralelo al de las degeneraciones, pero se produce en un mayor número que éstas.

A fin de disponer de una panorámica de las diferentes modificaciones inducidas por la infección con CP, en la tabla 1 se resumen los hallazgos encontrados. En este sentido, queremos destacar que los 3 principales fenómenos hallados en distintas estirpes celulares, y que podrían ponerse en relación con mecanismos clave encontrados en el proceso de formación de la placa ateromatosa, son la formación de agregados de células endoteliales degeneradas, el aumento de la movilidad y de la velocidad de migración de fibroblastos y células musculares lisas, y la formación de células espumosas a partir de células musculares lisas sometidas a la infección con CP.

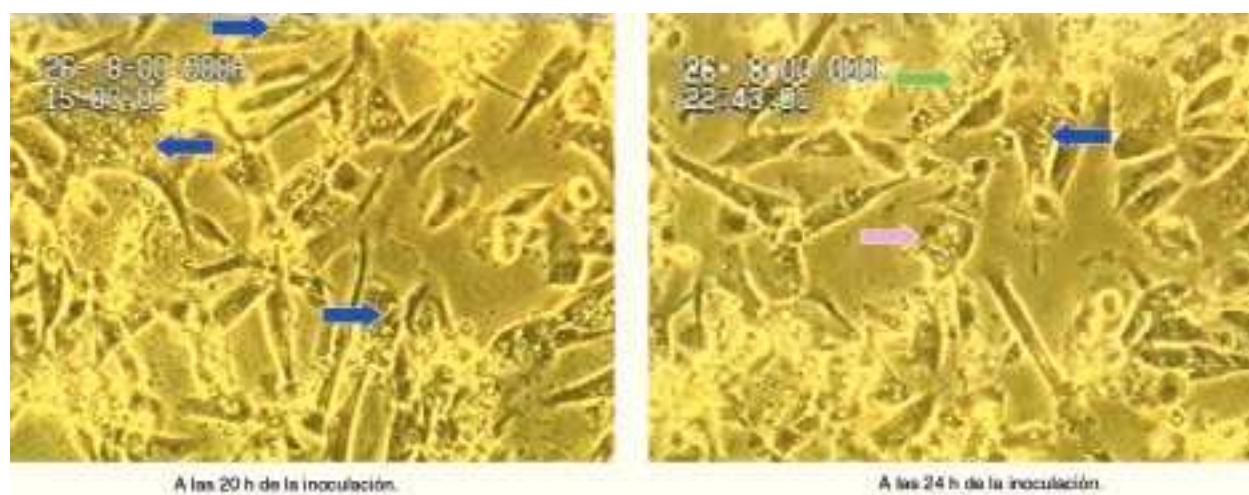


Figura 7. Efectos de *Chlamydia pneumoniae* en las células musculares lisas (T/GHA-VSMC) (células espumosas).

Tabla 1. Resumen de las modificaciones morfodinámicas inducidas por *Chlamydia pneumoniae*

	Epiteliales	Monocitos	Linfocitos	Fibroblastos	Músculo liso	Endotelio
Muerte tipo I	+	+	+	+	+	+
Muerte tipo II	+	+/-	+/-	+/-	+	-
Apoptosis	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+
Adherencia	-	+/-	-	-	+/-	++
Formación de agregados	-	+/-	+/-	-	+/-	++
Células espumosas	+/-	+/-	-	-	++	+
Movilidad	>	≥	>	>	>	>
Infección persistente	+	+	-	+/-	+/-	-
Actividad proliferativa	>	=	=	>	>	>

Discusión

Hemos demostrado lo que parecen ser efectos directos de la CP sobre la célula endotelial y que pueden explicar una lesión y/o disfunción de la misma. El endotelio infectado sobreexpresa otros receptores de membrana, por ejemplo para inmunocomplejos¹¹. Y, adicionalmente, estos inmunocomplejos resultan lesivos para las células endoteliales¹². Por lo tanto, ya sea directamente o a través de la reacción inmunológica, la lesión endotelial puede formar parte del inicio del proceso o de la inestabilidad de la placa.

La infección se acompaña de una reacción de fase aguda. A nivel local, provoca una sobreexpresión endotelial de citocinas, factores quimiotácticos y de proliferación, y un estímulo de la replicación que no sólo afecta a las células endoteliales, sino que alcanza a los macrófagos y a las células musculares lisas¹³⁻¹⁸. Además, la CP es capaz de activar factores de transcripción nuclear (NF-kappaB), con todo lo que esto supone para la expresión de moléculas proinflamatorias¹⁹.

Hemos encontrado cambios en la actividad mitótica y, por tanto, en la tasa de proliferación celular. De forma generalizada, se produce precozmente una inhibición de la proliferación, fenómeno que va seguido de un incremento en la actividad proliferativa, especialmente llamativo en las células endoteliales, en los fibroblastos y en las células musculares lisas. La transformación de las células hacia un fenotipo "reparador" puede considerarse como otro de los elementos que contribuyen al desarrollo de la lesión arteriosclerótica madura.

El endotelio infectado exhibe un aumento de la adherencia leucocitaria. Ello parece ser debido a que la replicación intraendotelial de CP se acompaña de un aumento de la adhesión mediada por moléculas tales como ELAM-1 e ICAM-1²⁰⁻²². En función de los resultados presentados, lo más llamativo es el incremento de la adhesividad lin-

monocitaria a las células endoteliales, y este fenómeno se presenta a las 2 h de la inoculación.

Algunas células pueden perder adhesividad al medio. Es el caso de los fibroblastos y de las células musculares lisas, hallazgo concordante con el incremento de la movilidad y de la velocidad de migración encontrada en tales células cuando se infectan con CP.

Ya se ha comentado el estímulo proliferativo de la infección con CP, que sigue a una fase de inhibición de la actividad mitótica. Estos resultados son coincidentes con los obtenidos por nosotros. El estímulo proliferativo parece ser debido a la acumulación citoplasmática de la proteína p53 en las células que sobreviven y comienzan a proliferar²³⁻²⁶. En nuestro trabajo el estímulo proliferativo es muy constante e importante en las células endoteliales, en los fibroblastos y en las células musculares lisas.

En nuestra experiencia, la aparición de células espumosas es un fenómeno muy significativo e intenso en las células musculares lisas. Dudosamente las hemos encontrado en los monocitos y en las células epiteliales. Se trata, además, de un fenómeno que acontece rápidamente. Otros autores han puesto de manifiesto esta transformación en los macrófagos⁹. Algunos trabajos previos han puesto de manifiesto las razones de esta transformación. Así, se han publicado datos que evidencian un aumento de los receptores *scavenger* en las células musculares lisas infectadas con CP, por lo que se incrementa la captación de LDL modificada. Además, la infección de tales células, así como la de macrófagos, es capaz de inducir la acumulación de colesterol. Este efecto de la infección, claramente aterogénico, se potencia con una dieta hipercolesterolemiante²⁷⁻³¹.

El papel de la apoptosis en el desarrollo y la complicación de la placa ateromatosa es objeto de controversia. Por una parte pudiera parecer que la apoptosis de células proliferadas podría ser un elemento beneficioso. Sin embargo, la apoptosis celu-

lar en la cápsula fibrosa que recubre la lesión puede provocar la rotura de la misma, con la desestabilización de la placa y la subsiguiente formación del trombo. Por lo tanto, la pérdida celular debería ser estudiada más en profundidad.

En el presente estudio, la apoptosis es un efecto evidente en los cultivos de células endoteliales infectados con CP, y no tan manifiesto en el resto de las estirpes celulares analizadas. Se ha descrito que la CP inhibe la apoptosis de las células mononucleares, a través de la inducción de IL-10³². Sin embargo, el incremento de las células apoptóticas endoteliales cuando se inocula CP sí debería ser tenido en consideración, ya que entra de lleno en el concepto de lesión endotelial.

Se puede encontrar una fase de muerte celular, rápida y precoz, en todas las estirpes celulares estudiadas, aunque alcanza a porcentajes muy variables del total de células. Otra fase de muerte celular, que comienza más tarde y dura más, se puede encontrar sólo en algún tipo celular: epitelio, músculo liso y, con menor frecuencia, en células mononucleares y fibroblastos. Esta última modalidad de muerte celular no la hemos encontrado en las células endoteliales, lo que quizás signifique que el efecto de la CP es sólo por actuación directa y no a través del ciclo intracelular. Este fenómeno puede estar implicado en los mecanismos de aterotrombosis y ser influenciado por la infección con CP.

Existe abundante bibliografía que pone de relieve la actividad procoagulante del endotelio previamente infectado, y algunos autores la ponen en relación con la depleción del factor Von Willebrand que se produce en los cultivos de células endoteliales inoculados con CP³³⁻³⁸. La presencia de agregados de células endoteliales degeneradas detectada en este trabajo se pueda relacionar con un posible estado procoagulante posterior. No obstante, creemos que el estudio en las mismas condiciones (infección con CP) de otros factores endoteliales, como es el caso del óxido nítrico (NO) y de factores reguladores de su síntesis (EDIP), podría aportar resultados esperanzadores.

Bibliografía

1. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993;362:801-9.
2. Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115-26.
3. Ridker P. Inflammation, infection and cardiovascular risk: how good is the clinical evidence? *Circulation* 1998;97:1671-5.
4. 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 cells. *Infect Immun* 1996;64:1614-20.
5. Gaydos CA. Growth in vascular cells and cytokine production by *Chlamydia pneumoniae*. *J Infect Dis* 2000;181(Suppl):473-8.
6. Kol A, Sukhova GK, Lichtman AH, Libby P. Chlamydial heat shock protein 60 in human atheroma and regulates macrophage tumor necrosis factor-alpha and matrix metalloproteinase expression. *Circulation* 1998;98:300-7.
7. Kalayoglu MV, Indrawaty L, Morris RP, Morrison SG, Yuan Y, Burne GI. Chlamydial virulence determinants in atherosclerosis: role of Chlamydial lipopolysaccharide and heat shock protein 60 in macrophage-lipoprotein interactions. *J Infect Dis* 2000;181 (Suppl): 583-9.
8. Hu H, Pierce GN, Zhong G. The atherogenic effects of Chlamydia are dependent on serum cholesterol and specific to *Chlamydia pneumoniae*. *J Clin Invest* 1999;103:747-53.
9. Kalayoglu MV, Byrne GI. A *Chlamydia pneumoniae* component that induces macrophage foam cell formation is chlamydial lipopolysaccharide. *Infect Immun* 1998;66: 5065-72.
10. Molestina RE, Miller RD, Ramirez JA, Summersgill JT. Infection of human endothelial cells with *Chlamydia pneumoniae* stimulates transendothelial migration of neutrophils and monocytes. *Infect Immun* 1999;67:1323-30.
11. Lopes-Virella MF, Virella G. Immunological and microbiological factors in the pathogenesis of atherosclerosis. *Clin Immunol Immunopathol* 1985;37:377-86.
12. Yamashiroya HM, Ghosh L, Yang R. Herpesviridae in the coronary arteries and aorta of young trauma victims. *Am J Pathol* 1988; 130:71-9.
13. Munro JM, Cotran RS. The pathogenesis of atherosclerosis: atherosclerosis and inflammation. *Lab Invest* 1988;58:249-61.
14. Halme S, Syrjala H, Bloign A. Lymphocyte responses to Chlamydia antigens in patients with coronary heart disease. *Eur Heart J* 1997;18:1095-101.
15. Tumilowicz JJ, Gawlik ME, Powell BB. Replication of cytomegalovirus in human arterial smooth muscle cells. *J Virol* 1985;56:839-45.
16. Span AHM, Mullers W, Miltenburg AM. Cytomegalovirus induced PMN adherence in relation to an ELAM-1 antigen present on infected endothelial cell monolayers. *Immunology* 1991;72:355-60.
17. Ong G, Thomas BJ, Mansfield AO. Detection and widespread distribution of *Chlamydia pneumoniae* in the vascular system and its possible implications. *J Clin Pathol* 1996;49:102-6.
18. Sammalkorpi KT, Valtonen VV, Maury CPJ. Lipoproteins and acute phase response during acute infection. Interrelationships between C-reactive protein and serum amyloid A protein and lipoproteins. *Ann Med* 1990;22:397-401.
19. Miller SA, Selzman CH, Shames BD, Barton HA, Johnson SM, Harken AH. *Chlamydia pneumoniae* activates Nuclear Factor kappaB and Activator Protein 1 in human vascular smooth muscle and induces cellular proliferation. *J Surg Res* 2000;90: 76-81.
20. Span AHM, Van Boven CPA, Bruggeman CA. The effect of cytomegalovirus infection on the adherence of polymorphonuclear leukocytes to endothelial cells. *Eur J Clin Invest* 1989;19: 542-8.
21. Zajac BA, O'Neill K, Friedman HM. Increased adherence of human granulocytes to herpes simplex virus type 1 infected endothelial cells. *In vitro Cell Dev Biol* 1988;24:321-5.
22. Shahgasempour S, Woodroffe SB, Garnett HM. Alterations in the expression of ELAM-1, ICAM-1 and VCAM-1 after in vitro infection of endothelial cells with a clinical isolate of human cytomegalovirus. *Microbiol Immunol* 1997;41:121-9.
23. Benditt EP, Benditt JM. Evidence of a monoclonal origin of human atherosclerotic plaques. *Proc Nat Acad Sci USA* 1973;70: 1753-6.
24. Speir E, Modali R, Huang ES. Potential role of human cytomegalovirus and p53 interaction in coronary restenosis. *Science* 1994; 265:391-4.
25. Zhu H, Shen Y, Shenk T. Human cytomegalovirus IE1 and IE2 proteins block apoptosis. *J Virol* 1995;69:7960-70.
26. Kovacs A, Weber ML, Burns LJ. Cytoplasmatic sequestration of p53 in cytomegalovirus-infected human endothelial cells. *Am J Pathol* 1996;149:1531-9.

27. Nicholson AC, Hajjar DP. Herpes virus in atherosclerosis and thrombosis: etiologic agents or ubiquitous bystanders? *Thromb Vasc Biol* 1998;18:339-48.
28. Fabricant CG, Fabricant J, Minick CR. Virus-induced atherosclerosis. *J Exp Med* 1978;148:335-40.
29. Fabricant CG, Krook L, Gillespie JH. Virus-induced cholesterol crystals. *Science* 1973;181:566-7.
30. Hajjar DP, Fabricant CG, Minick CR. Virus induced atherosclerosis. Herpes virus infection alters aortic cholesterol metabolism and accumulation. *Am J Pathol* 1986;122:62-70.
31. Zhou Y, Guetta E, Yu Z. Human cytomegalovirus increases modified low density lipoprotein uptake and scavenger receptor mRNA expression in vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1996;98: 2129-38.
32. Geng Y, Shane RB, Berencsi K, Gonczol E, Zaki MH, Margolis DJ, et al. *Chlamydia pneumoniae* inhibits apoptosis in human peripheral blood mononuclear cells through induction of IL-10. *J Immunol* 2000;164:5522-9.
33. Van Dam-Mieras MCE, Muller AD, Van Hinsbergh VWM. The procoagulant response of cytomegalovirus infected endothelial cells. *Thromb Haemost* 1992;68:364-70.
34. Bruggeman CA, Debie WHM, Muller AD. Cytomegalovirus alters the von Willebrand factor content in human endothelial cells. *Thromb Haemost* 1988;59:264-8.
35. Etingin OR, Silverstein RL, Friedman HM. Viral activation of the coagulation cascade: molecular interactions at the surface of infected endothelial cells. *Cell* 1990;61:657-62.
36. Vercellotti GM. Proinflammatory and procoagulant effects of herpes simplex infection on human endothelium. *Blood Cells* 1990; 16:209-16.
37. Rydzial ELG, Wright JF. Prothrombinase assembly on an enveloped virus: evidence that the cytomegalovirus surface contains procoagulant phospholipid. *Blood* 1994;11:3749-57.
38. Fryer RH, Schwobe EP, Woods ML. Chlamydia species infect human vascular endothelial cells and induce procoagulant activity. *J Invest Med* 1997;45:168-74.