

# *Chlamydomphila pneumoniae*: desde su proteómica hasta la arteriosclerosis

Enrique Villegas<sup>a</sup>, Antonio Sorlózano<sup>a</sup>, Ana Camacho<sup>b</sup> y José Gutiérrez<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Microbiología. Universidad de Granada. Granada. <sup>b</sup>Laboratorio Vircell SL. Granada. España.

***Chlamydomphila pneumoniae* es un patógeno humano intracelular, muy prevalente, con un ciclo único de desarrollo bifásico, que causa infecciones respiratorias en las vías altas y neumonía, y que actualmente se cree que puede ser un factor de riesgo para el desarrollo de la arteriosclerosis.**

*C. pneumoniae* muestra una gran complejidad en los antígenos de superficie de la membrana externa, ya sea por ser específicos pero poco inmunógenos (como la proteína principal de la membrana externa) o bien por ser muy inmunógenos pero poco específicos entre las especies de clamidias. Todo esto hace necesario profundizar en el estudio de nuevos antígenos que sean altamente inmunodominantes y específicos de especie. En este sentido, las proteínas polimórficas de la membrana externa (PMP) son *a)* específicas de clamidia, *b)* se exponen en la superficie de la bacteria y *c)* son muy inmunógenas, todo lo cual las hace acreedoras de un importante potencial de aplicación en los diferentes ensayos de laboratorio. Otras, como la proteína de choque térmico 60 (HSP 60), parecen estar relacionadas con la arteriosclerosis, por inducir un ataque inmunológico sobre la pared endotelial.

A partir de los estudios existentes hasta la fecha, para obtener una conclusión sobre la relación entre la infección y la arteriosclerosis, faltan estudios con suficiente número de pacientes y muestras, prospectivo, comparativo frente a controles sanos, que utilicen la combinación de varias técnicas microbiológicas (directas e indirectas) en un mismo sujeto y muestra, relacionando los resultados con la actividad de la enfermedad.

**Palabras clave:** *Chlamydomphila pneumoniae*. Proteómica. Arteriosclerosis.

*Chlamydomphila pneumoniae*: from proteomics to arteriosclerosis

***Chlamydomphila pneumoniae* is a highly prevalent intracellular human pathogen with a unique biphasic life cycle. It is a common cause of upper respiratory infection**

and pneumonia, and is currently being studied as a potential risk factor for the development of atherosclerotic cardiovascular disease.

The outer membrane surface antigens of *C. pneumoniae* are highly complex: some, such as the major outer membrane protein, are specific, but poorly immunodominant, whereas others have stronger immunogenicity, but are cross-reactive among *Chlamydia* species. Therefore, new, highly immunodominant, species-specific antigens should be sought. In this regard, the polymorphic membrane proteins (PMPs) are *a)* unique to *Chlamydiae*, *b)* often exposed on the surface of the bacteria, and *c)* highly immunogenic; these factors make them potential candidates for application in laboratory assays. Other chlamydial antigens, such as heat shock protein (HSP) 60, have been associated with atherosclerotic lesions because of their ability to induce an immunological attack on the endothelial wall. Over the last decade, several studies have suggested a potential role of chronic *C. pneumoniae* infection in human atherosclerosis. Nevertheless, prospective studies with sufficiently large samples and a healthy comparison group, using a combination of direct and indirect microbiological techniques in the same subject and sample, are needed to establish a relationship between the infection and disease activity.

**Key words:** *Chlamydomphila pneumoniae*. Proteomics. Atherosclerosis.

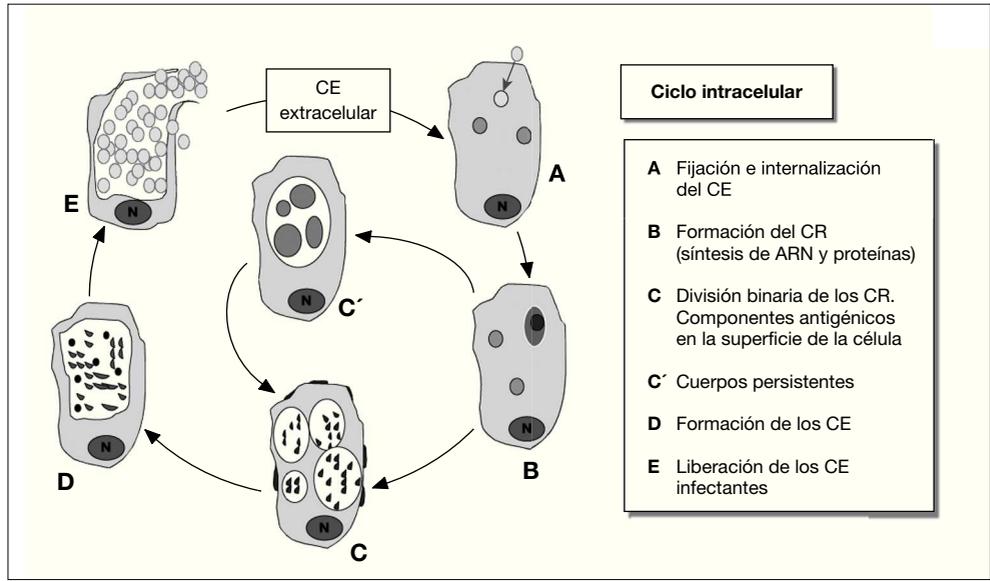
## Taxonomía del orden *Chlamydiales*

Históricamente, el orden *Chlamydiales* incluye la familia *Chlamydiaceae*, con un solo género, *Chlamydia*, y cuatro especies: *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia pneumoniae* y *Chlamydia pecorum*. Más recientemente, a partir del análisis de las secuencias de los genes del ARNr 16S y 23S, se comprobó que existían diferencias entre *C. trachomatis* y el grupo *C. psittaci-C. pneumoniae*, lo que llevó a dividir esta familia en dos géneros diferentes<sup>1</sup>: *Chlamydia* y *Chlamydomphila*, respectivamente. No obstante, junto con los géneros anteriores, patógenos humanos, existen otros, pertenecientes al orden *Chlamydiales*, que carecen, en estos momentos, de interés clínico.

*Chlamydomphila pneumoniae* es muy conocido actualmente por ser un agente productor de enfermedad respiratoria aguda, incluyendo neumonía, bronquitis, sinusitis

Correspondencia: Dr. J. Gutiérrez.  
Departamento de Microbiología. Facultad de Medicina.  
Avda. de Madrid, 11. 8008 Granada. España.  
Correo electrónico: josegf1199@hotmail.com

Manuscrito recibido el 2-3-2007; aceptado para su publicación el 11-6-2007.



**Figura 1.** Ciclo celular de *Chlamydomydia pneumoniae*. CE: cuerpo elemental; CR: cuerpo reticular.

y faringitis y, así como por las investigaciones que la relacionan con la arteriosclerosis, entre otras enfermedades. Este organismo fue aislado por primera vez en 1965, de la conjuntiva de un niño taiwanés durante la vacunación antitracoma<sup>2</sup>.

**Ciclo celular**

Durante su ciclo celular adopta dos morfologías distintas, una forma infecciosa extracelular, el cuerpo elemental, y una forma replicativa intracelular, el cuerpo reticular. El primero es pequeño y denso, tiene un tamaño de entre 0,2 y 0,4 µm, y una forma característica de pera. Morfológicamente, es distinto de los cuerpos elementales redondeados de *C. trachomatis* y *C. psittaci*. No obtiene nutrientes del exterior y carece de actividad metabólica y de replicación. Posee una pared celular rígida, aunque lo suficientemente laxa como para permitir esta forma de pera, gracias a proteínas ricas en aminoácidos azufrados, que forman un entramado denso, que le hace resistente a los factores ambientales.

El cuerpo reticular es más grande, con un tamaño de entre 0,6 y 1,2 µm. Procede de la transformación del cuerpo elemental tras entrar en la célula hospedadora. Éste obtiene nutrientes del citoplasma de la célula y se multiplica por división binaria. Los cuerpos reticulares son lábiles, osmóticamente inestables e incapaces de infectar a otras células.

El ciclo celular se inicia cuando un cuerpo elemental, por su zona más aguda, se une a una célula por un mecanismo del tipo adhesina-receptor (fig. 1A). Si bien la identidad precisa de ambas moléculas continúa siendo incierta, parece tratarse de un sistema del tipo glucosamino-glucano parecido al sulfato de heparina. Penetran en la célula por endocitosis y se forma un fagosoma, pero no un fagolisosoma<sup>3</sup>. Es característica del orden de las *Chlamydiales* su habilidad para inhibir la fusión lisosomal, por mecanismos no definidos, permitiendo al cuerpo elemental habitar en una vesícula, rodeada de una membrana pro-

tectora, llamada cuerpo de inclusión, visible al microscopio óptico (fig. 1B). Entonces, se modifica la membrana externa del cuerpo elemental, desaparecen los aminoácidos azufrados y se conforman, funcionalmente, las porinas.

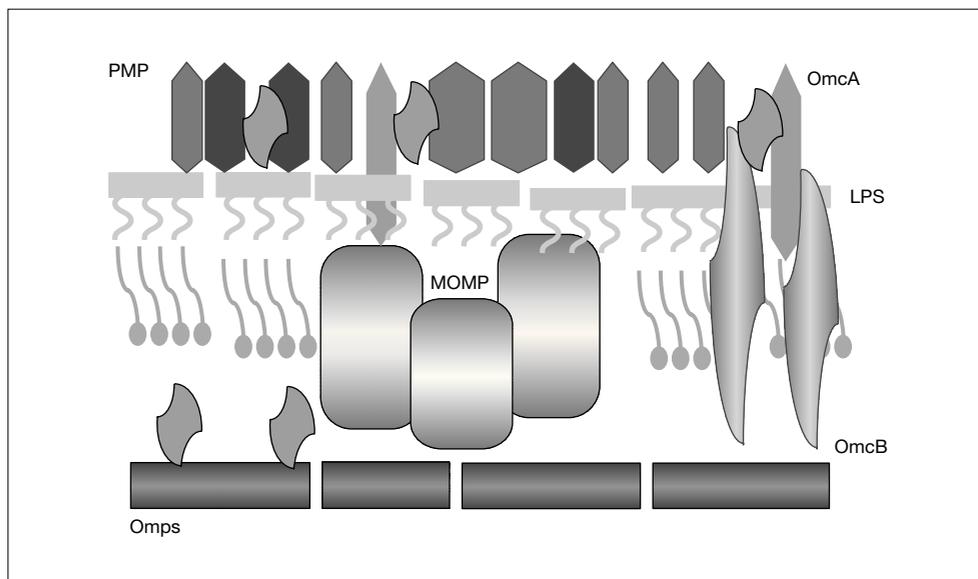
El paso de cuerpo elemental a cuerpo reticular, y viceversa, requiere un ciclo intracelular de 2-4 días en *C. pneumoniae*. El cuerpo elemental se transforma en reticular cuando penetran metabolitos, como fosfatos ricos en energía, y aminoácidos, aumentando la actividad metabólica. Estos procesos iniciales incluyen la síntesis de nuevas proteínas, reducción de los enlaces disulfuro y la activación de la adenosina trifosfatasa<sup>4</sup>.

Los cuerpos reticulares se dividen de forma binaria e incesante, agrupados en el fagosoma (fig. 1C). El cuerpo de inclusión y la célula infectada muestran en la superficie antígenos derivados de la bacteria. Los cuerpos reticulares madurarán, reduciendo su tamaño y reorganizando su pared celular, a modo de cuerpos elementales. En ese momento, los cuerpos de inclusión contendrán cuerpos reticulares maduros, futuros elementales (fig. 1D).

La liberación de los cuerpos elementales de las células infectadas se puede realizar por lisis celular, extrusión o exocitosis, y se cierra el ciclo de desarrollo permitiendo la infección de nuevas células (fig. 1E).

Por determinadas condiciones ambientales, o dependiendo del estado del agente infeccioso o de la célula hospedadora, el ciclo se puede detener, permanente o temporalmente, en la fase de cuerpo reticular, que se denomina ahora cuerpo persistente (fig. 1C'). Así, Beatty et al<sup>5</sup>, realizando cultivos celulares en líneas de epitelio de faringe humana, determinaron que uno de los mecanismos que induce a entrar a la bacteria en un estado persistente es la presencia de interferón gamma (IFN-γ).

Estos cuerpos persistentes son cuerpos reticulares más grandes, que, por el menor número de porinas, se dividen lentamente. Este estado críptico conlleva la reducción en la expresión de antígenos, cambios de la morfología y la pérdida de la infectividad. Se piensa que estas formas podrían tener un papel importante en la patogénesis de la infección crónica, debido, entre otros, a la presencia en



**Figura 2.** Proteínas de la envuelta celular de *Chlamydomphila pneumoniae*. LPS: lipopolisacárido; Omc: complejo proteico de membrana externa; PMP: proteínas polimórficas de la membrana externa.

este estadio de proteínas de choque térmico (*heat shock protein* [HSP])<sup>6</sup>. Esta fase puede ser temporal y luego continuarse el ciclo, como antes se ha comentado.

Los cuerpos persistentes podrían ser una adaptación de la bacteria al hospedador para evitar el sistema inmunológico, reducir una virulencia innecesaria o mantenerse viable en condiciones adversas. Su presencia podría tener, como en el caso de *C. trachomatis*<sup>7</sup>, repercusiones diagnósticas (ya que determinarían falsos negativos en el inmunodiagnóstico, por la escasa expresión de antígenos bacterianos, o en el cultivo celular, por la menor viabilidad del cuerpo persistente), y terapéuticas (por una menor respuesta al tratamiento debido a la pérdida de porinas y la menor expresión de dianas).

## Antígenos de *C. pneumoniae*

Los antígenos de *C. pneumoniae* son complejos y sólo parcialmente conocidos. Las primeras descripciones fueron realizadas por Kuo et al<sup>2</sup>. Se localizan en la pared celular (fig. 2), y, entre otros, destacan los siguientes grupos (tabla 1)<sup>8</sup>:

### Lipopolisacárido

El lipopolisacárido es un antígeno presente en todos los miembros de la familia *Chlamydiaceae*. Su presencia se ha demostrado mediante fijación del complemento, inmunofluorescencia y ELISA<sup>9,10</sup> y es una causa importante de las reacciones cruzadas que, con frecuencia, se observan en la serología de *Chlamydiaceae*.

Está presente en los cuerpos elementales, en los reticulares, en la membrana de las células infectadas y en la región proximal de células anejas a la anterior, pero no infectadas. Su presencia se ha demostrado a las 20 h de la infección celular. Dado que la superficie de los cuerpos reticulares es 10 veces superior a la de los elementales, durante la transformación de aquéllos, es probable que sean expulsadas al exterior grandes cantidades de lipopolisacárido a través de vesículas, desde la inclusión intracelular,

al citoplasma y a la superficie de la célula. Este hecho apoya la hipótesis que implica al lipopolisacárido en la patogenia de las manifestaciones clínicas asociadas a *C. pneumoniae*<sup>11</sup>.

De manera indirecta, a partir de la capacidad de neutralización de los anticuerpos monoclonales, pero no bien caracterizada, se han supuesto también, en el lipopolisacárido de *C. pneumoniae*, la presencia de epítomos específicos de especie<sup>12</sup>. Del mismo modo, los estudios con anticuerpos han sugerido que, durante el proceso de transformación de los cuerpos reticulares en elementales, la estructura del lipopolisacárido puede sufrir algún cambio<sup>9</sup>.

### Proteínas de la membrana externa

#### Proteína principal de la membrana externa (MOMP)

Uno de los antígenos mejor caracterizados en las especies de *Chlamydia* es la MOMP. Es la proteína que se halla en mayor proporción (60%) en los cuerpos elementales y reticulares<sup>10</sup>.

Tiene funciones de porina. Para ello, se debe encontrar químicamente reducida, situación que modifica las uniones entre las proteínas ricas en cisteína y que permite dicha función<sup>13</sup> en los cuerpos reticulares<sup>10</sup> activos metabólicamente.

Esta proteína es común a todos los miembros de la familia *Chlamydiaceae*, aunque presenta diferencias estructurales y de inmunogenicidad en cada una de las especies. Tiene cuatro dominios variables, que tienden a situarse en la superficie de la membrana, y cinco constantes. La secuencia, en *C. pneumoniae*, no se considera inmunodominante. Esto se ha intentado explicar por la supuesta incapacidad del sistema inmunológico para identificar los epítomos superficiales de la MOMP, a causa de un mecanismo de interposición o enmascaramiento que ejercerían las proteínas polimórficas de la membrana externa (PMP)<sup>14</sup>. Esto no impide que algunos anticuerpos monoclonales sí puedan reconocer antígenos especie-específicos de *C. pneumoniae* y neutralizar la infección *in vitro*<sup>15</sup>.

TABLA 1. Características de los antígenos descritos en *C. pneumoniae*

Antígenos	Tamaño	Función	Presencia	Inmunogenicidad	pI*
Lipopolisacárido	Desc	Integridad estructural	CE y CR	Inmunogénico género-específico	Desc
<b>Asociados a la membrana externa</b>					
MOMP	39,5 kDa	Porina	CE y CR	No inmunodominante	6,1
OmcA	9 kDa	Integridad estructural	CE	No inmunogénica	6,1
OmcB	2 × 60 kDa	Adhesina	CE	Inmunogénica género-específica	5,6
PMP 1-21	≈ 100 kDa	Porinas lipoproteicas	CE y CR	Inmunogénicas	5-9
Lipoproteína	22 kDa	Desc	Desc	Desc	Desc
Lipoproteína (CPn0278)	30,2 kDa	Desc	Desc	Desc	6,5
Omp H	19,5 kDa	Desc	Desc	Desc	4,7
Omp 85	89 kDa	Desc	Desc	Inmunogénica	7,7
<b>Asociados al proceso celular</b>					
IncA	39 kDa	Desarrollo y supervivencia en la inclusión	CI	No inmunogénica	Desc
IncB	18 kDa	Desarrollo y supervivencia en la inclusión	CI	No inmunogénica	Desc
IncC	21 kDa	Desarrollo y supervivencia en la inclusión	CI	No inmunogénica	Desc
HSP 60	60 kDa	Chaperona	CE y CR	Inmunogénica	Desc
HSP 70	70 kDa	Chaperona	CE y CR	Inmunogénica	5,6
Sistema de secreción III	52 kDa**	Secreción de proteínas	CE y CR	No inmunogénico	5,9**
Proteína respuesta baja en calcio	43 kDa	Regulador sistema secreción III	Desc	Desc	5
<b>Asociados a la membrana interna</b>					
Proteína hipotética	89 kDa	Desc	Desc	Inmunogénica	Desc
<b>Asociados al metabolismo</b>					
Enolasa	46 kDa	Invasión tisular, coagulación	Desc	Inmunogénica	4,7

\*Valores teóricos del pI<sup>8</sup>.

\*\*Molestina RE, Klein JB, Miller RD, Pierce WH, Ramírez JA. Proteomic analysis of differentially expressed *Chlamydia pneumoniae* genes during persistent infection of HEp-2 cells. Infect Immun. 2002;70:2976-81.

CE: cuerpo elemental; CI: cuerpo de inclusión; CR: cuerpo reticular; Desc: desconocido. HSP: proteína de choque térmico; Inc: proteínas de inclusión; PMP: proteínas polimórficas de membrana externa.

**Proteínas del complejo de membrana externa (OMC) ricas en cisteína**

Están presentes en grandes cantidades en el cuerpo elemental y se sintetizan de manera tardía en la maduración del cuerpo reticular hacia el elemental. No están presentes en el cuerpo reticular (a diferencia de la MOMP)<sup>16</sup>.

La proteína OmcA recuerda a las lipoproteínas mureínicas de las bacterias gramnegativas. Es una adhesina que se fija a las moléculas de heparina, facilitando la infectividad. Está anclada en la membrana externa por su región lipídica, mientras que la zona peptídica se extiende hacia el periplasma<sup>17</sup>.

Más controvertida es la estructura de la OmcB<sup>18</sup>. Se sabe que la posición de las cisteínas es muy mantenida y es muy inmunogénica, pero comparte epítomos con otras especies bacterianas. Finalmente, los puentes disulfuro de OmcB forman uniones cruzadas con los dominios periplásmicos de OmcA y de otras proteínas, contribuyendo a la estabilidad del cuerpo elemental<sup>17</sup>. Algunos autores proponen que este complejo es el equivalente del peptidoglucano, cuya presencia en *Chlamydia* es discutida<sup>19</sup>.

**Proteínas polimórficas de la membrana externa (PMP)**

Existen hasta 21 tipos en *C. pneumoniae*. Su superficialidad e inmunogenicidad justifican el interés por estas proteínas<sup>20</sup>. Son ricas en serina y fenilalanina, y son polimórficas, ya que sus genes sufren mutaciones que originan variaciones en la estructura<sup>21</sup>. Se piensa que dicha variabilidad depende del número de residuos de guanina, y no está claro si se debe a la presión del sistema inmunológico, o es intrínseca. Biológicamente, actúan como citolisinas, que contribuyen a la rotura de la célula hospedadora y a la salida del cuerpo elemental, y, además, posiblemente, tienen un papel en la entrada al hospedador<sup>22</sup>.

**Otras proteínas de la membrana externa**

Otras proteínas presentes en *C. pneumoniae*, y cuya función no es bien conocida, se reflejan en la tabla 1.

**Proteínas del proceso celular**

**Proteínas de inclusión (Inc)**

Se localizan en la membrana de los cuerpos de inclusión de *C. pneumoniae* y el resto de miembros del orden *Chlamy-*

*diales*. Cada proteína posee un dominio hidrofóbico único de 50 a 80 aminoácidos<sup>23</sup>. Sus funciones se han relacionado con el desarrollo de la inclusión, la evasión del sistema inmunológico, la adquisición de nutrientes e, incluso, son mediadores en los procesos de transición de cuerpos reticulares a elementales, y viceversa. Constituyen una familia de proteínas que tienen un importante papel en la infección, el crecimiento y la supervivencia en el hospedador celular<sup>24</sup>.

### Chaperonas

Parte de ellas son HSP y corrigen plegamientos incorrectos de proteínas desnaturalizadas. La HSP 60 parece estar implicada en los daños ocasionados en las arterias de los sujetos infectados debido a la hiperestimulación de macrófagos y a la inducción de los autoanticuerpos, por mimetismo molecular con la proteína humana<sup>25</sup>, citocinas proinflamatorias y metaloproteinasas, que degradarían el colágeno<sup>26</sup>. Se relaciona, por tanto, con la arteriosclerosis, por inducir un ataque a la pared endotelial, mediante una reacción de hipersensibilidad retardada, propia de las infecciones crónicas<sup>27</sup>, que puede ser el eslabón entre los microorganismos involucrados y la autoinmunidad<sup>28</sup>.

Por su parte, la HSP 70 está presente de forma temprana en la infección y tiene un importante papel en el transporte de proteínas a través de las membranas<sup>29</sup>.

### Sistema de secreción tipo III y proteínas de respuesta baja en calcio

Las características<sup>30,31</sup> de estas proteínas presentes en *C. pneumoniae*, y cuya función no es bien conocida, se reflejan en la tabla 1.

### Proteínas relacionadas con el metabolismo<sup>32</sup>

Entre las proteínas relacionadas con el metabolismo energético está la enolasa. Esta proteína de la superficie bacteriana comparte antígenos con la enolasa humana, presente en las células hematopoyéticas, por lo que, en las infecciones por clamidia, la inducción de anticuerpos anti-enolasa podría causar reacciones autoinmunes inflamatorias<sup>8,33</sup>.

### Peptidoglucano

Su presencia se ha sospechado por estudios, inicialmente referidos a los cuerpos reticulares de *C. trachomatis*, en los que se comprobó que antibióticos como penicilina o cicloserina inhibían el proceso de división celular<sup>34</sup>. Asimismo, se ha demostrado la presencia, en el genoma del serovar D de *C. trachomatis*, de genes para la síntesis del peptidoglucano<sup>35</sup>. Sin embargo, los estudios realizados con objeto de detectar ácido N-acetilmurámico, la molécula característica del peptidoglucano, no han sido concluyentes. Entonces, es posible que el peptidoglucano esté presente, de forma transitoria y escasa, en determinados momentos del ciclo vital, y con funciones muy concretas. Apoyando esta hipótesis se ha sugerido que, en el cuerpo reticular, sustituiría la función de las proteínas ricas en cisteína de la pared celular del CE, participando en la división de la bacteria<sup>36</sup>, y en la adhesión a la membrana y superficie celular<sup>37</sup>.

### Patogenia de la infección por *C. pneumoniae*

Para penetrar en el organismo humano la bacteria utiliza, entre otras, la célula epitelial columnar o de tran-

sición, infectando las vías respiratorias y los monocitos. Inicialmente lo hace en las células respiratorias de las vías altas y/o bajas y se disemina por la sangre gracias a los monocitos. Esto le permite la colonización a distancia de muchos lugares del organismo, tales como las arterias. Tras la infección inicial del epitelio respiratorio de las vías altas el sujeto puede quedar como portador debido a un fracaso en la actuación de la respuesta inmunológica<sup>38</sup>.

Al igual que con *C. trachomatis*, las personas infectadas por *C. pneumoniae* desarrollan una respuesta inmunológica celular<sup>39</sup>. Ésta es la más importante, suele ser poco intensa, pero persistente en el tiempo, y puede resolver la infección.

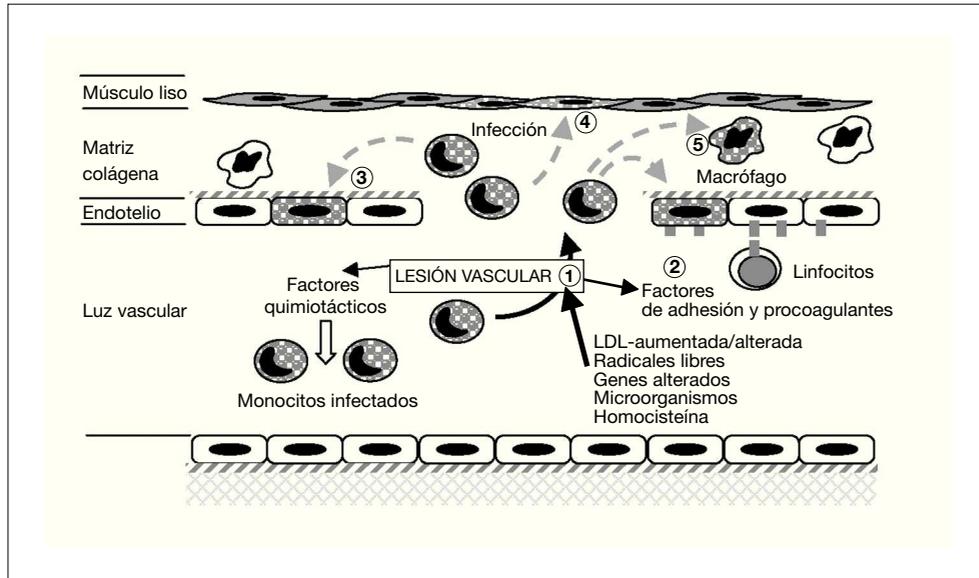
La bacteria, durante la infección de la célula hospedadora, detiene la apoptosis, lo que contribuye a la replicación y facilita una posible cronificación. Las células T CD4 son activadas por los antígenos de *Chlamydia*, que derivan del contenido de las vacuolas, y se relacionan con las moléculas de clase II del sistema HLA, que se exponen en las células infectadas como macrófagos, dendritas y células endoteliales; el reconocimiento de los antígenos producirá la secreción de citocinas. Éstas activan los macrófagos y las células B para producir anticuerpos<sup>6</sup>.

El IFN- $\gamma$  inhibe la replicación de los patógenos intracelulares estrictos, por inducción de la producción de indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO). La IDO degrada el triptófano a quineurina y N-formilquineurina, privando al patógeno de triptófano. Como resultado, el crecimiento bacteriano puede ser restringido. Cuando el triptófano es repuesto, la inhibición se revierte<sup>40</sup>. Carlin y Weller<sup>41</sup> investigaron algunos agentes inmunomoduladores que podían actuar sinérgicamente con los IFN, en la restricción del crecimiento de *Chlamydia* por incremento de la actividad de la IDO. La adición de interleucina 1 (IL-1) aumentó la producción de IDO y suprimió el crecimiento de *Chlamydia*. La IL-1 $\beta$  parece ser la más importante. Entonces es posible que un déficit de IFN- $\gamma$  sea el causante de la aparición de una infección persistente, a través de la menor inducción de la IDO (v. ciclo replicativo en fig. 1).

La reinfección es frecuente a lo largo de la vida porque surgen variantes alélicas, debido a la presión inmunológica o recombinación genética en la infección mixta. Además, no se ha demostrado la capacidad de neutralización de los anticuerpos para evitar nuevas infecciones<sup>15</sup>. Finalmente, hay evidencias de que una infección reciente supeurada puede conferir protección frente a enfermedades graves posteriores, aunque no a la reinfección<sup>42</sup>.

El período de incubación de la enfermedad aguda es de varias semanas (media de tres), más largo que para otros muchos patógenos respiratorios<sup>43</sup>. A través de la investigación de los anticuerpos, generalmente mediante el empleo de pruebas de microinmunofluorescencia<sup>44</sup>, se ha demostrado que la infección tiene una presencia universal<sup>45</sup>, que los sujetos se infectan alguna vez en su vida y que la seroprevalencia es más importante a medida que aumenta la edad debido a las reinfecciones repetidas.

La bacteria es capaz de originar infecciones asintomáticas en niños, por infección primaria. Esto no excluye la posibilidad de ocasionar faringitis, otitis y sinusitis. Así, la bacteria se ha asociado con sinusitis purulenta<sup>46</sup>, otitis media supurada<sup>47</sup> y faringitis, pero se desconoce la frecuencia real de estas enfermedades<sup>48</sup>.



**Figura 3.** Patogénesis de la arteriosclerosis y su relación con la infección por *Chlamydomphila pneumoniae* (1). (1) Lesión de los vasos por diferentes causas. (2) Esta lesión incrementa la síntesis de proteína quimiotáctica 1 de monocito y moléculas de adhesión que fijan leucocitos infectados; actividad procoagulante de lipoproteínas tisulares, con trombosis y adhesión de plaquetas. La célula endotelial se infecta por *C. pneumoniae* intramucocítica. (3) Los monocitos migran al subendotelio, liberan citocinas proinflamatorias y expresan la molécula CD14. El interferón  $\gamma$  aumenta la dioxigenasa intramucocítica que oxida el triptófano hasta quineurina. (4) Se infectan las células musculares lisas y (5) los macrófagos.

Las infecciones sintomáticas suelen ocurrir en adultos, debido a reinfección, y menos frecuentemente por reactivación. Así, ocasiona bronquitis y neumonía (hasta el 20% de las neumonías extrahospitalarias ocurridas en los mayores de 65 años y el 5% de los casos de bronquitis y sinusitis) y es una causa de reactivación clínica de los sujetos con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)<sup>38</sup>.

Más recientemente, se ha asociado con otros procesos de etiología hasta ahora no bien conocidos, tales como la arteriosclerosis.

### *C. pneumoniae* y su relación con la arteriosclerosis

Actualmente, el área de investigación más activa en relación con este patógeno es la posible influencia de la infección vascular por *C. pneumoniae* en la patogénesis de las enfermedades cardiovasculares arterioscleróticas. Esto se debe a que los factores de riesgo clásicos para la arteriosclerosis sólo explican el 60% de los casos, y nuevos agentes, tales como *C. pneumoniae*, se han asociado con la enfermedad<sup>49</sup>.

Desde hace años se han obtenido muchas evidencias microbiológicas de la presencia de *C. pneumoniae* en las placas de aterosclerosis de las arterias coronarias, carótida, aorta, ilíaca y femoral, mediante visualización con microscopía electrónica o inmunohistoquímica y pruebas de PCR<sup>50-52</sup>.

Observaciones procedentes de la infección experimental de conejos sugieren que la infección por *C. pneumoniae* puede facilitar el desarrollo de placas de aterosclerosis en animales hipercolesterolémicos. La lesión inicial inducida por el colesterol podría ser necesaria para que pueda infectar y residir en la arteria<sup>53</sup> o una consecuencia de la infección. Esto se apoya en el hecho de que la infección induce, *in vitro*, un marcado aumento de la captación de ésteres de colesterol por los monocitos humanos incubados en presencia de lipoproteínas de baja densidad (LDL), de modo que éstos acaban evolucionando a células espumosas<sup>54</sup>. En

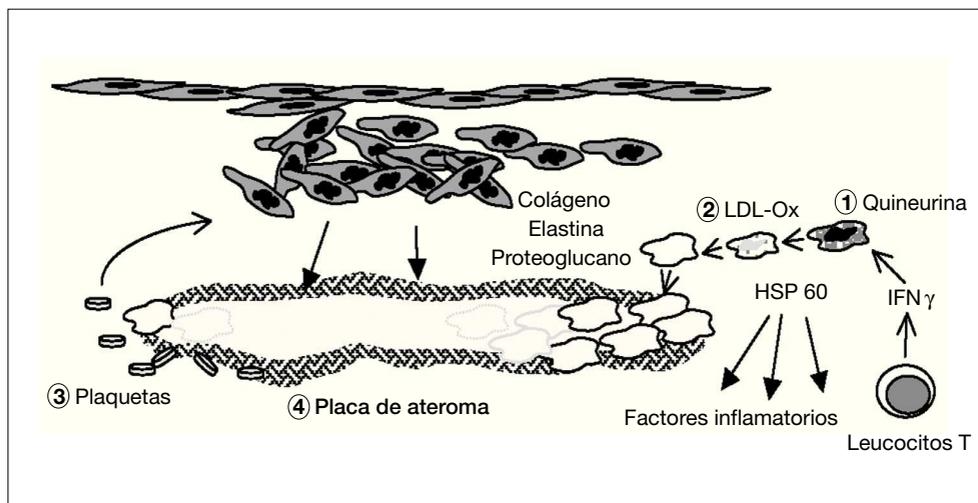
tonces ¿cómo se podría producir la placa de aterosclerosis en el curso de la infección?

Resumiendo los conocimientos existentes hasta la fecha, podríamos establecer una secuencia de los acontecimientos (figs. 3 y 4). Se sabe que los vasos se pueden lesionar por: una concentración elevada de LDL y/o una alteración de ésta; la presencia de radicales libres causados por el tabaco, hipertensión o diabetes mellitus; alteraciones genéticas; agentes infecciosos como herpesvirus o *C. pneumoniae*; concentraciones plasmáticas elevadas de homocisteína, o una combinación de cualquiera de estos factores<sup>55</sup>. Por lo expuesto anteriormente se sabe que *C. pneumoniae* puede infectar, en el vaso, el endotelio, previamente lesionado por cualquiera de las causas anteriores, el músculo liso y los macrófagos, con más facilidad en presencia de grasas. La infección de las células endoteliales permitiría liberar cuerpos elementales al medio extracelular, que servirían para extender la infección localmente, o por vía sistémica<sup>4,56</sup>.

La célula endotelial infectada incrementa la síntesis, por un lado, de la proteína quimiotáctica-1 del monocito y también de moléculas de adhesión (selectina E, molécula de adhesión intercelular-1, y molécula de adhesión vascular-1, que fijan nuevos leucocitos, los cuales pueden estar infectados) y, por otro lado, de factores tisulares procoagulantes, lipoproteínas tisulares, con trombosis y adhesión de plaquetas<sup>57</sup>.

Los monocitos, que no son susceptibles al ciclo replicativo completo de la bacteria, se activan, migran al subendotelio, liberan citocinas proinflamatorias (factor de necrosis tumoral [TNF], IL-1, 6 y 8, factor nuclear kappa B) y expresan la molécula CD14<sup>58</sup>. El IFN- $\gamma$ , de los LTh1 sensibilizados<sup>59</sup>, aumenta la dioxigenasa intramucocítica de las células endoteliales y mononucleares, y oxida el triptófano hasta N-formilquineurina y quineurina (fig. 4). Esta sustancia reduce, según hemos visto en el ciclo replicativo y la patogénesis de la infección, la salida de los cuerpos elementales (lo que explican los falsos negativos del cultivo de placas de aterosclerosis), aumenta la persistencia intracelular porque surgen las formas crípticas denominadas CPE, re-

**Figura 4.** Patogenia de la arteriosclerosis y su relación con la infección por *Chlamydomydia pneumoniae* (II). (1) La quineurina reduce la salida de *C. pneumoniae* y aumenta la expresión de la proteína de choque térmico 60 (HSP 60). (2) Los macrófagos infectados engloban las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y se transforman en células grasas. (3) Las plaquetas agregadas liberan un factor de crecimiento celular que hace proliferar un músculo liso indiferenciado que libera colágeno, elastina y proteoglucanos con formación de tejido fibroso. (4) Se forma la placa madura con un core de lípidos y colesterol rodeada de una capa fibrosa.



duce la expresión de la MOMP y aumenta la de la HSP 60<sup>60,61</sup>. Así, se ha visto que si no hay arteriosclerosis, no se observa la HSP 60 en la pared arterial. Ésta estimula la síntesis de autoanticuerpos y, de nuevo, a los macrófagos, produciendo más citocinas y metaloproteinasas que degradan el colágeno<sup>62</sup>. De esta manera, se establecería una infección crónica con presencia de CPE en la que el antígeno más abundante es el lipopolisacárido<sup>63</sup>.

Kalayoglu y Byrne<sup>54</sup> demostraron que los macrófagos infectados engloban más LDL, por acción del lipopolisacárido, transformándose en células grasas. Las plaquetas agregadas liberarían un factor de crecimiento celular que hace proliferar un músculo liso indiferenciado, que libera colágeno, elastina y proteoglucanos con formación de tejido fibroso. Finalmente, se forma la placa de ateroma madura, con un centro de lípidos y colesterol, rodeada de una capa fibrosa.

Acerca de la asociación entre la enfermedad arterial periférica (EAP) oclusiva y la infección por esta bacteria se han publicado más de 50 estudios<sup>64</sup>, caracterizados por un grupo de casos y controles y metodologías analíticas bien definidas, en los que se analizan, mediante alguna prueba independiente, esta relación. De éstos, se ha concluido que existe, de forma estadísticamente significativa, una asociación cuando se utilizan pruebas inmunohistoquímicas, PCR anidada en biopsias de arterias, estudios de PCR en muestras no arteriales, pruebas de ELISA y MIF para detectar valores altos de inmunoglobulina G (IgG) e IgA, y otros métodos directos de detección de la bacteria diferentes de los anteriores. Sin embargo, no se ha encontrado asociación cuando se ha empleado la PCR simple en biopsias arteriales, en las pruebas de MIF que detectan IgG en niveles bajos, o IgM, y en los estudios de ELISA para detectar IgM. Según lo anterior, el hallazgo de la asociación entre la EAP y la infección por *C. pneumoniae* depende del método empleado en estos trabajos. La mayoría establece una relación con una probabilidad variable, pero no se encuentra esta relación con los métodos de PCR menos sensibles y la presencia de IgM antibacteriana, lo que parecería lógico, ya que la EAP hay que entenderla como una enfermedad crónica. En relación con la detección del ADN de *C. pneumoniae*, en la mayor parte de los estudios publica-

dos sólo se informa de las regiones amplificadas, que han sido muy diferentes, pero no del método de extracción del ADN y de la sensibilidad de la prueba empleada. Esto puede justificar las discrepancias de los resultados obtenidos en los estudios, ya que las metodologías han sido muy diferentes.

Aunque la asociación arteriosclerosis-*Chlamydomydia* es aparente en muchos estudios, no implicaría que exista una relación causal, ya que faltan, entre otros, estudios que empleando un análisis de los marcadores de la inflamación justifiquen la relación patogénica causa-efecto.

Finalmente, hay que señalar que otros agentes infecciosos pueden estar involucrados en la aparición de la arteriosclerosis<sup>65</sup>, pues, en general, las infecciones crónicas pueden ejercer un efecto proaterogénico al actuar a nivel sistémico o de forma local sobre la pared vascular<sup>66</sup>.

En conclusión, aún nos encontramos en estadios muy iniciales en el conocimiento de la proteómica de *C. pneumoniae*. Su estudio ayudará decisivamente a conocer los mecanismos patogénicos finales por los que ocasiona la enfermedad en el hombre y, por tanto, a saber si esta bacteria desempeña un papel en enfermedades como la arteriosclerosis.

#### Agradecimientos

Este estudio fue financiado por el Proyecto de Investigación CTS-138 de la Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía (Descripción de inmunógenos de *Chlamydomydia pneumoniae* reconocidos por los sueros de sujetos con enfermedad arterial periférica. Relaciones clínicas).

#### Bibliografía

1. Everett KD, Bush RM, Andersen AA. Emended description of the order *Chlamydiales*, proposal of *Parachlamydiaceae* fam. nov. and *Simkaniaceae* fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family *Chlamydiaceae*, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *Int J Syst Bacteriol.* 1999;49: 415-40.
2. Kuo CC, Chen HH, Wang SP, Grayston JT. Identification of a new group of *Chlamydomydia psittaci* strains called TWAR. *J Clin Microbiol.* 1986;24:1034-7.
3. Kuo CC, Chi EY, Grayston JT. Ultrastructural study of entry of *Chlamydomydia* strain TWAR into HeLa cells. *Infect Immun.* 1988;56:1668-72.

4. Stratton WC, Mitchel WM. The pathogenesis of Systemic Chlamydial infections: theoretical considerations of host cell energy depletion and its metabolic consequences. *AIDIEX*. 1997;16:33-40.
5. Beatty WL, Belanger TA, Desai AA, Morrison RP, Byrne GI. Tryptophan depletion as a mechanism of gamma interferon-mediated chlamydial persistence. *Infect Immun*. 1994;62:3705-11.
6. Stratton WC. The role of *Chlamydia* in connective tissue diseases. *AIDIEX*. 1998;17:9-16.
7. Geisler WM, Suchland RJ, Rockey DD, Stamm WE. Epidemiology and clinical manifestations of unique *Chlamydia trachomatis* isolates that occupy nonfusogenic inclusions. *J Infect Dis*. 2001;184:879-84.
8. Montigiani S, Falugi F, Scarselli M, Finco O, Petracca R, Galli G, et al. Genomic approach for analysis of surface proteins in *Chlamydia pneumoniae*. *Infect Immun*. 2002;70:368-79.
9. Campbell S, Richmond SJ, Yates PS, Storey CC. Lipopolysaccharide in cells infected by *Chlamydia trachomatis*. *Microbiology*. 1994;140:1995-2002.
10. Peterson EM, de la Maza LM, Brade L, Brade H. Characterization of a neutralizing monoclonal antibody directed at the lipopolysaccharide of *Chlamydia pneumoniae*. *Infect Immun*. 1998;66:3848-55.
11. Birkelund S, Lundemose AG, Christiansen G. Immunoelectron microscopy of lipopolysaccharide in *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun*. 1989;57:3250-3.
12. Bavoi P, Ohlin A, Schachter J. Role of disulfide bonding in outer membrane structure and permeability in *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun*. 1984;44:479-85.
13. Wyllie S, Ashley RH, Longbottom D, Herring AJ. The major outer membrane protein of *Chlamydia psittaci* functions as a porin-like ion channel. *Infect Immun*. 1998;66:5202-7.
14. Christiansen G, Ostergaard L, Birkelund S. Molecular biology of the *Chlamydia pneumoniae* surface. *Scand J Infect Dis Suppl*. 1997;104:5-10.
15. Puolakkainen M, Parker J, Kuo CC. Characterization of a *Chlamydia pneumoniae* epitope recognized by species specific monoclonal antibodies. En: Orfila J, Byrne GL, Cherneskey A, Grayston JT, Jones JP, Ridgway GL, et al, editors. *Chlamydial infections*. Bologna: Società Editrice Esculapio; 1994. p. 185-8.
16. Newhall WJ. Biosynthesis and disulfide cross-linking of outer membrane components during the growth cycle of *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun*. 1987;55:162-8.
17. Everett KD, Desiderio DM, Hatch TP. Characterization of lipoprotein EnvA in *Chlamydia psittaci* 6BC. *J Bacteriol*. 1994;176:6082-7.
18. Hatch TP, Allan I, Pearce JH. Structural and polypeptide differences between envelopes of infective and reproductive life cycle forms of *Chlamydia* spp. *J Bacteriol*. 1984;157:13-20.
19. Hatch TP. Disulfide cross-linked envelope proteins: the functional equivalent of peptidoglycan in chlamydiae? *J Bacteriol*. 1996;178:1-5.
20. Lindquist EA, Stephens RS. Transcriptional activity of a sequence variable protein family in *Chlamydia trachomatis*. En: Stephens RS, Byrne GI, Christiansen G, Clarke IN, Grayston JT, Rank RG, et al, editors. *Chlamydial infections. Proceedings of the Ninth International Symposium on Human Chlamydial Infections*. San Francisco, EEUU: International Chlamydia Symposium; 1998. p. 259-62.
21. Grimwood J, Olinger L, Stephens RS. Expression of *Chlamydia pneumoniae* polymorphic membrane protein family genes. *Infect Immun*. 2001;69:2383-9.
22. Vandahl BB, Pedersen AS, Gevaert K, Holm A, Vandekerckhove J, Christiansen G, et al. The expression, processing and localization of polymorphic membrane proteins in *Chlamydia pneumoniae* strain CWL029. *BMC Microbiol*. 2002;2:36.
23. Rockey DD, Viratytosin W, Bannantine JP, Suchland RJ, Stamm WE. Diversity within inc genes of clinical *Chlamydia trachomatis* variant isolates that occupy non-fusogenic inclusions. *Microbiology*. 2002;148:2497-505.
24. Toh H, Miura K, Shirai M, Hattori M. In silico inference of inclusion membrane protein family in obligate intracellular parasites chlamydiae. *DNA Res*. 2003;10:9-17.
25. Domeika M, Domeika K, Paavonen J, Mardh PA, Witkin SS. Humoral immune response to conserved epitopes of *Chlamydia trachomatis* and human 60-kDa heat-shock protein in women with pelvic inflammatory disease. *J Infect Dis*. 1998;177:714-9.
26. Lamb DJ, El-Sankary W, Ferns GA. Molecular mimicry in atherosclerosis: a role for heat shock proteins in immunisation. *Atherosclerosis*. 2003;167:177-85.
27. Taylor HR, Maclean IW, Brunham RC, Pal S, Whittum-Hudson J. Chlamydial heat shock proteins and trachoma. *Infect Immun*. 1990;58:3061-3.
28. Fong IW, Chiu B, Viira E, Tucker W, Wood H, Peeling RW. Chlamydial heat-shock protein-60 antibody and correlation with *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerotic plaques. *J Infect Dis*. 2002;186:1469-73.
29. Hirono S, Dibrov E, Hurtado C, Kostenuk A, Ducas R, Pierce GN. *Chlamydia pneumoniae* stimulates proliferation of vascular smooth muscle cells through induction of endogenous heat shock protein 60. *Circ Res*. 2003;93:710-6.
30. Hueck CJ. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1998;62:379-433.
31. Subtil A, Parsot C, Dautry-Varsat A. Secretion of predicted Inc proteins of *Chlamydia pneumoniae* by a heterologous type III machinery. *Mol Microbiol*. 2001;39:792-800.
32. Vandahl BB, Birkelund S, Demol H, Hoorelbeke B, Christiansen G, Vandekerckhove J, et al. Proteome analysis of the *Chlamydia pneumoniae* elementary body. *Electrophoresis*. 2001;22:1204-23.
33. Fontan PA, Pancholi V, Nociari MM, Fischetti VA. Antibodies to streptococcal surface enolase react with human alpha-enolase: implications in post-streptococcal sequelae. *J Infect Dis*. 2000;182:1712-21.
34. Matsumoto A, Manire GP. Electron microscopic observations on the effects of penicillin on the morphology of *Chlamydia psittaci*. *J Bacteriol*. 1970;101:278-85.
35. Stephens RS, Kalman S, Lammel C, Fan J, Marathe R, Aravind L, et al. Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: *Chlamydia trachomatis*. *Science*. 1998;282:754-9.
36. Holtje JV, Fiedler W, Rotering H, Walderich B, van Duin J. Lysis induction of *Escherichia coli* by the cloned lysis protein of the phage MS2 depends on the presence of osmoregulatory membrane-derived oligosaccharides. *J Biol Chem*. 1988;263:3539-41.
37. Rockey DD, Matsumoto A. The chlamydial developmental cycle. En: Brun YV, Shimkets LJ, editors. *Prokaryotic development*. Washington: Blackwell Publishing; 1999. p. 403-25.
38. Kumar S, Hammerschlag MR. Acute respiratory infection due to *Chlamydia pneumoniae*: current status of diagnostic methods. *Clin Infect Dis*. 2007;44:568-76.
39. Braun J, Laitko S, Treharne J, Eggens U, Wu P, Distler A, et al. *Chlamydia pneumoniae*; a new causative agent of reactive arthritis and undifferentiated oligoarthritis. *Ann Rheum Dis*. 1994;53:100-5.
40. Malinverni R, Kuo CC, Campbell LA, Grayston JT. Reactivation of *Chlamydia pneumoniae* lung infection in mice by cortisone. *J Infect Dis*. 1995;172:593-4.
41. Carlin JM, Weller JB. Potentiation of interferon-mediated inhibition of *Chlamydia* infection by interleukin-1 in human macrophage cultures. *Infect Immun*. 1995;63:1870-5.
42. Thom DH, Grayston JT, Campbell LA, Kuo CC, Diwan VK, Wang SP. Respiratory infection with *Chlamydia pneumoniae* in middle-aged and older adult outpatients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1994;13:785-92.
43. Kishimoto T, Kimura M, Kubota Y. An outbreak of *Chlamydia pneumoniae* infection in households and schools. En: Orfila J, Byrne GL, Cherneskey A, Grayston JT, Jones JP, Ridgway GL, et al, editors. *Chlamydial infections*. Bologna: Società Editrice Esculapio; 1994. p. 465-8.
44. Moazed TC, Grayston JT, Campbell LA. A rabbit model of *Chlamydia pneumoniae* infection. En: Abstracts of the 94th General Meeting of the American Society for Microbiology. Washington: American Society for Microbiology; 1994; Abstr. B-214. p. 66.
45. Montes M, Cilla G, Alcorta M, Perez-Trallero E. High prevalence of *Chlamydia pneumoniae* infection in children and young adults in Spain. *Pediatr Infect Dis J*. 1992;11:972-3.
46. Hashigucci K, Ogawa H, Suzuki T, Kazuyama Y. Isolation of *Chlamydia pneumoniae* from the maxillary sinus of a patient with purulent sinusitis. *Clin Infect Dis*. 1992;15:570-1.
47. Ogawa H, Hashiguchi K, Kazuyama Y. Recovery of *Chlamydia pneumoniae*, in six patients with otitis media with effusion. *J Laryngol Otol*. 1992;106:490-2.
48. Hammerschlag MR, Chirgwin K, Roblin PM, Gelling M, Dumornay W, Mandel L, et al. Persistent infection with *Chlamydia pneumoniae* following acute respiratory illness. *Clin Infect Dis*. 1992;14:178-82.
49. Gutiérrez J, Linares J, Camacho A, Palanca M, Maroto C, Ros E, et al. Descripción de inmunógenos de *Chlamydia pneumoniae* reconocidos por el suero de sujetos con enfermedad arterial periférica. *Med Clin (Barc)*. 2006;126:721-7.
50. Kuo CC, Gown AM, Benditt EP, Grayston JT. Detection of *Chlamydia pneumoniae* in aortic lesions of atherosclerosis by immunocytochemical stain. *Arterioscler Thromb*. 1993;13:1501-4.
51. Kuo CC, Shor A, Campbell LA, Fukushi H, Patton DL, Grayston JT. Demonstration of *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerotic lesions of coronary arteries. *J Infect Dis*. 1993;167:841-9.
52. Grayston JT, Kuo CC, Coulson AS, Campbell LA, Lawrence RD, Lee MJ. *Chlamydia pneumoniae* (TWAR) in atherosclerosis of the carotid artery. *Circulation*. 1995;92:3397-400.
53. Fong IW, Chiu B, Viira E, Fong MW, Jang D, Mahony J. Rabbit model for *Chlamydia pneumoniae* infection. *J Clin Microbiol*. 1997;35:48-52.
54. Kalayoglu M, Byrne G. Induction of macrophage foam cell formation by *Chlamydia pneumoniae*. *J Infect Dis*. 1998;177:725-9.
55. Ross R. Atherosclerosis. An inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999;340:115-26.
56. 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.

57. Fryer RH, Schwobe EP, Woods ML, Rodgers GM. *Chlamydia* species infect human vascular endothelial cells and induce procoagulant activity. *J Invest Med*. 1997;45:168-74.
58. Summersgill JT, Sahney NN, Gaydos CA, Quinn TC, Ramirez JA. Inhibition of *Chlamydia pneumoniae* growth in HEp-2 cells pretreated with gamma interferon and tumor necrosis factor alpha. *Infect Immun*. 1995;63:2801-3.
59. 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.
60. Sakash JB, Byrne GI, Lichtman A, Libby P. Cytokines induce indoleamine 2,3-dioxygenase expression in human atheroma-associated cells: implications for persistent *Chlamydomphila pneumoniae* infection. *Infect Immun*. 2002;70:3959-61.
61. Kane CD, Vena RM, Ouellette SP, Byrne GI. Intracellular tryptophan pool sizes may account for differences in gamma interferon-mediated inhibition and persistence of chlamydial growth in polarized and nonpolarized cells. *Infect Immun*. 1999;67:1666-71.
62. 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.
63. Wyrick PB, Knight ST, Paul TR, Rank RG, Barbier CS. Persistent chlamydial envelope antigens in antibiotic-exposed infected cells trigger neutrophil chemotaxis. *J Infect Dis*. 1999;179:954-66.
64. Gutiérrez J, de Dios Luna J, Linares J, del Rosario Montes M, Quesada E, Rojas A, et al. Relationship between peripheral arterial occlusive disease (PAOD) and chronic *Chlamydomphila (Chlamydia) pneumoniae* infection: a meta-analysis. *Thromb Haemost*. 2005;93:1153-60.
65. Gois J, Higuchi M, Reis M, Diament J, Sousa J, Ramires J, Oliveira S. Infectious agents, inflammation, and growth factors: how do they interact in the progression or stabilization of mild human atherosclerotic lesions? *Ann Vasc Surg*. 2006;20:638-45.
66. Ameriso SF, Ruiz A, Pérez M. Infección, inflamación e ictus cerebral. *Rev Esp Cardiol*. 2004;4:7-12.