



Detección de agentes infecciosos y otros factores asociados a aterosclerosis en pacientes sometidos a cirugía cardíaca.

Detection of infectious agents and others atherosclerotic factors in patients undergoing cardiac surgery.

Dr. Yasser Colao Jiménez¹, DrC. Consuelo Correa Sierra², DrC. Vivian Kouri Cardella¹, DrC. Manuel Nafeh Abi-Rezk¹, Dra. Yuliet González Nieves¹, Dra. Mahelys Ramírez Hernández¹.

¹ Hospital Hermanos Ameijeiras.. La Habana. Cuba.

² Departamento de Virología. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí. La Habana. Cuba.

RESUMEN

Introducción: En Cuba, la segunda causa de muerte son las enfermedades cardíacas, especialmente las de origen isquémico, causada por la aterosclerosis coronaria, donde los agentes infecciosos aparecen descritos como factores de riesgo en su desarrollo.

Objetivo: Identificar la relación entre la infección por el Citomegalovirus, el Virus Herpes Simple y la *Clamydophila pneumoniae* y su posible protagonismo en la aterosclerosis en pacientes operados de cirugía cardíaca.

Métodos: Se estudiaron 34 pacientes que requirieron una intervención cardíaca, 18 con enfermedad coronaria y 16 con enfermedad valvular, los que dieron su consentimiento a participar en el estudio, se determinó su estado serológico con respecto a Citomegalovirus y virus del herpes simple previo al acto quirúrgico. Se les extrajeron muestras de tejido y se les realizó determinación de ADN de Citomegalovirus(CMV), Virus Herpes Simple(VHS) y Clamidophila pneumoniae.

Resultados: El hábito de fumar fue el factor de riesgo más frecuente (64,7%), seguida en orden de frecuencia por Hipertensión Arterial (58,8%), la cual fue particularmente frecuente para el grupo coronario (66,6%)..Los pacientes coronarios con IgG anti CMV representan el 77,7% y con IgG anti VHS el 66,6%. De igual forma los valvulares con IgG anti CMV representan el 68,7% y con IgG anti VHS el 56,25%. En ninguna muestra de tejido se demostró la presencia del genoma de estos agentes.

Conclusiones: Se demuestra la asociación entre factores de riesgo conocidos en pacientes con cardiopatía isquémica, existe elevada prevalencia serológica de exposición a los agentes infecciosos estudiados pero no se demuestra su presencia en los tejidos estudiados.

Palabras clave: Cirugía Cardíaca, aterosclerosis, infección.

Abstract

We studied 34 patients, from July 1 to August 31, 2014 at Ameijeiras hospital. A cardiac surgery were performed in all of them, 18 with coronary disease and 16 with valvular disease (10 aortic and 6 mitral) this work was approved by the Ethics Committee responsible for this investigation. We determined they serological status in relation with cytomegalovirus (CMV) and herpes simple virus (HSV) before cardiac surgery and we used samples of tissues during surgery (Left Internal mammary artery, 18.Right Internal mammary artery, 1. Ascending Aortic wall 9, Valvular tissues, 16) to find DNA of cytomegalovirus, herpes simple virus and Clamidophila pneumonia with PCR. The most frequent risk factor was smoking habit (64,7%), represent 61,1% in coronary disease group and 68,7% in valvular. Hypertension was the second one risk factor (58,8%), particularly elevated in coronary disease group(66,6%). The patients in coronary group positive IgG against CMV represent the 77, 7% and with IgG against HSV 66,6%. In the valvular group positive IgG against CMV represent the 68, 7% and with IgG against HSV 56,25%. No one sample of tissue showed genomic presence of *C. pneumoniae*, CMV or HSV with PCR.

Key words: Cardiac Surgery, Atherosclerosis, infection.

Correspondencia: Dr. Yasser Colao Jiménez. Hospital Hermanos Ameijeiras.La Habana. Cuba. Teléfono: (537) 2074649.

Correo electrónico: yassercolao@infomed.sld.cu





INTRODUCCIÓN

En Cuba, la segunda causa de muerte son las enfermedades cardíacas, con una tendencia al aumento; el mayor protagonismo en la mortalidad la tienen aquellas provocadas por las enfermedades isquémicas del corazón. Anualmente se realizan numerosas intervenciones quirúrgicas para el tratamiento de la enfermedad coronaria en Cuba, de estas, un número considerable se realizan en el cardiocentro del Hospital Hermanos Ameijeiras.

En la formación de placas de ateroma se plantean que influyen varios factores de riesgo conocidos, entre los que podemos citar el hábito de fumar, la hipercolesterolemia, la hipertensión arterial, la diabetes mellitus, los posibles factores genéticos dados por los antecedentes patológicos familiares de enfermedad aterosclerótica. La mayoría de estos factores se encuentran con elevada frecuencia en la población cubana.

El papel de algunos agentes infecciosos en la formación y el desarrollo de las placas de ateroma ha sido investigado con anterioridad. Entre los agentes que comúnmente se asocian a este tipo de patología se encuentran las virales entre las que podemos citar al Citomegalovirus (CMV), el Virus Herpes Simple (VHS) y el Virus Epstein Barr (VEB) y entre las causas bacterianas la *Clamidophila pneumoniae* y el *Helicobacter pilori*. La patogénesis y la asociación de estos microorganismos es un fenómeno que se encuentra en debate en la comunidad científica. Se ha encontrado el genoma de estos agentes y al agente mismo viable en las placas ateromatosas, lo que pudiera indicar algún nivel de participación en la formación y desarrollo de estas, sugiriéndose la presencia de un fenómeno inflamatorio crónico. Los agentes virales implicados en la formación de las placas de ateroma pertenecen a la familia *Herpesviridae*, que tienen la característica de persistir en el organismo humano en una fase llamada de latencia, en la que no hay actividad o multiplicación viral. Entre los tejidos o células en los que los herpesvirus hacen latencia se encuentran los linfocitos B (VEB), los polimorfonucleares (CMV) y las células endoteliales. Además estos virus tienen una amplia prevalencia a nivel mundial, que llega a ser mayor del 90% en países en vías de desarrollo, por lo que su asociación con aterogénesis puede ser difícil de demostrar. En las últimas décadas se ha demostrado el papel que desempeña la inflamación en la

aterogénesis y las manifestaciones clínicas de la enfermedad coronaria. Las denominadas placas activas o vulnerables, que son responsables de la aparición de eventos coronarios agudos, como el infarto de miocardio y la angina inestable, contienen numerosas células inflamatorias. La cuestión de si las infecciones pueden causar lesiones arteriales difusas y crónicas, ha sido motivo de debate por muchos años. Sin embargo, solo en fecha reciente se tienen pruebas respecto a las relaciones específicas entre la aterosclerosis y diversos agentes infecciosos. Evidencias recientes indican que existe un estímulo antigénico crónico en pacientes con enfermedad coronaria y que este podría ser causado por agentes infecciosos. Entre estos, la *C. pneumoniae* parece ser, en el momento actual, el agente más probable y sobre el cual más estudios se han publicado. Con el objetivo de identificar si existe alguna relación entre la presencia de los agentes CMV, VHS y *C. pneumoniae* y la enfermedad aterosclerótica en pacientes cubanos, investigamos la presencia de infección previa por el CMV y el VHS así como la detección y cuantificación del genoma del CMV, el VHS y la *C. pneumoniae* en un fragmento de tejido vascular, obtenido de pacientes que se realizaron una intervención quirúrgica terapéutica cardiovascular, así como su asociación a factores de riesgo de enfermedad aterosclerótica.

Objetivo

General: Identificar la relación entre la infección por el Citomegalovirus, el Virus Herpes Simple y la *Clamidophila pneumoniae* con la aterosclerosis en pacientes operados de cirugía cardíaca.

Específicos

1. Caracterizar a los pacientes del estudio en cuanto a variables sociodemográficas, tipo de enfermedad cardíaca, presencia de factores de riesgo coronarios y proceder quirúrgico empleado.
2. Determinar la presencia de la infección previa al Citomegalovirus y el Virus Herpes Simple
3. Detectar y cuantificar el genoma del Citomegalovirus, el Virus Herpes Simple y la *Clamidophila pneumoniae* en tejido vascular.
4. Determinar la posible relación entre la presencia del genoma de los agentes infecciosos (CMV, VHS y *C. pneumoniae*) en tejido vascular y la infec-



ción previa por estos con los factores de riesgo cardiovascular de los pacientes operados de cirugía cardiaca.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se estudiaron de forma descriptiva y prospectiva 34 pacientes, 18 de los cuales tienen enfermedad coronaria y 16 enfermedad valvular (10 Aórticos y 6 Mitrals) que aceptaron participar en el estudio mediante la firma del consentimiento informado.

Todos los pacientes fueron operados de cirugía de revascularización miocárdica o sustitución valvular por prótesis mecánica de la válvula afectada; en el periodo desde el 2 de mayo hasta el 31 de julio del 2014 en el cardiocentro del Hospital Hermanos Ameijeiras.

Los pacientes se distribuyeron en 2 grupos, los coronarios (18 pacientes) con evidencia por coronariografía de aterosclerosis coronaria severa y los valvulares (16 pacientes) sin evidencia por coronariografía de aterosclerosis coronaria alguna.

Procedimiento

Toma de muestras

A todos los pacientes, durante el acto quirúrgico, se les realizó una extracción de sangre, para la obtención de suero, así como muestras de tejido según el tipo de cirugía para cada caso en particular.

Las muestras de tejido se extrajeron teniendo en cuenta el principio de no comprometer la vida o la salud del paciente, por lo que solo se tomaron aquellas muestras de tejido que normalmente queda excedente o de desecho. A los pacientes sometidos a cirugía de revascularización miocárdica se les tomó tejido de la arteria mamaria y en los casos que requirieron anastomosis aórtica se les extrajo también la muestra de tejido aórtico. A ningún paciente se le extrajo tejido de las coronarias afectadas en aras de no incrementar el riesgo quirúrgico. A los pacientes sometidos a cirugía de sustitución valvular se les tomó tejido de la válvula afectada ya sea aórtica o mitral. Se procesaron un total de 44 muestras de tejidos distribuidas de la siguiente manera: Mamaria Izquierda: 18, Mamaria Derecha: 1, Pared Aorta ascendente: 9, Válvula Aórtica: 10 y Válvula Mitral: 6.

Determinación de IgG específica anti-CMV y anti-VHS

Para determinar la presencia de IgG específica anti-CMV y anti-VHS, se empleó el método de ELISA, siguiendo las recomendaciones del fabricante para cada uno de los estuches empleados (DiaSorin, Italia): IgG CMV- ETI-CYTOK-G PLUS, P002033 e IgG VHS 1 y 2- ETI-VHSK-G ½, P002025

Determinación de ADN de CMV, VHS y Chlamyphila pneumoniae

Extracción del ADN

El ADN de las muestras de tejidos (aorta, valvular o arteria mamaria) se extrajeron mediante el estuche comercial QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. La cantidad de muestra de tejido utilizada para la extracción fue de 1 gramo.

Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR-TR).

Se utilizaron tres estuches comerciales de PCR-TR para la detección y cuantificación del CMV, el VHS (tipos 1 y 2) y la *Chlamyphila pneumoniae*; siguiendo los protocolos descritos por los fabricantes (TIB MOLBIOL, Alemania), los cuales están diseñados para realizarse en la plataforma LightCycler (Roche, Alemania). Los estuches incluyen la mezcla (LightMix) de los cebadores de las zonas conservadas dentro del genoma de los virus estudiados, las sondas específicas para cada agente mediante hibridación de fluorescencia, los cebadores y las sondas para el control interno, así como el fragmento del genoma del control interno que se amplifica. Para la reacción se utilizó además otra mezcla que contiene la enzima de la reacción (LightCycler FastStart DNA Master HybProbe). Para el análisis y cuantificación del número de copias presentes en cada muestra se empleó el método de la derivación secundaria máxima de la versión 3.3 del programa automático del LightCycler. Los resultados se convirtieron a copias/mL. Las muestras clínicas se consideraron negativas (cuantificación no detectable) si el valor del punto de corte sobrepasaba el ciclo 40 del PCR-TR o si la cuantificación estuvo por debajo de 10 copias/mL, de acuerdo al límite de detección analítico descrito en el estuche comercial. Los resultados de la cuantificación positivos a: CMV, VHS o *C. pneumoniae* en las muestras se informaron en número de copias/mL. Para evitar las posibles con-



taminaciones se tuvieron en cuenta el empleo de todas las medidas de bioseguridad y de trabajo en laboratorio estipuladas en el IPK. Para descartar contaminaciones en cada uno de los ensayos se incluyó un control negativo (agua destilada estéril libre de ARNasas y ADNasas).

Estudio estadístico

Los datos se expresan como media \pm desviación estándar (DE) y en porcentos. Para la comparación de medias de los mismos pacientes utilizamos el test de la t de Student-Fisher para datos emparejados. Se consideraron estadísticamente significativos los valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Variables socio demográficas

Se estudiaron 34 pacientes con un promedio de edad fue de $58,8 \pm 9,02$ años, de los cuales 15 fueron mujeres y 19 hombres. En el grupo de los pacientes con coronariopatía predominaron los hombres (72%) mientras que en los valvulares predominaron las mujeres (60%).

Factores de riesgo coronarios

El hábito de fumar fue el factor de riesgo más frecuente (64,7%), representando el 61,1% en los coronarios y el 68,7% en los valvulares seguida en orden de frecuencia por la Hipertensión Arterial (58,8%), la cual fue particularmente frecuente para el grupo coronario (66,6%). Otros factores de riesgo frecuentes fueron la Diabetes Mellitus (22,2%) y la fiebre reumática (25% de los pacientes del grupo de los valvulares, 3 de ellos con estenosis mitral y solo 1 con estenosis aórtica).

El promedio de colesterol total en sangre fue de 4,8 mmol/L $\pm 1,4$ para los coronarios y de 5,0 mmol/L $\pm 0,72$ para los valvulares. Para los triglicéridos fue de 1,9 mmol/L $\pm 0,58$ para los coronarios y de 1,93 mmol/L $\pm 1,5$ para los valvulares.

Determinación de la infección por CMV, VHS y *C. pneumoniae*

Los resultados serológicos para determinar la presencia de IgG anti-CMV y VHS se demuestra en la tabla 1.

Tabla 1 Prevalencia de IgG anti CMV y IgG anti VHS en los grupos de pacientes estudiados.

Grupo	IgG anti CMV		IgG anti VHS	
	No.	%	No.	%
Coronarios	14	41,2	12	35,3
Valvulares	11	32,3	9	26,5
Total	25	73,5	21	61,7

Fuente: Planilla de recolección de datos.

La tabla 1 expresa los resultados con relación al total de pacientes, pero dentro del mismo grupo los pacientes coronarios con IgG anti CMV representan el 77,7% y con IgG anti VHS el 66,6%. De igual forma los valvulares dentro del mismo grupo, con IgG anti CMV representan el 68,7% y con IgG anti VHS el 56,25%. Estas diferencias no resultaron significativas debido a la elevada frecuencia.

En ninguna de las muestras de tejidos se demostró la presencia del genoma de *C. pneumoniae*, CMV o VHS mediante PCR-TR, por lo que no fue posible realizar asociaciones entre estos factores.

DISCUSIÓN

La aterosclerosis tiene un origen multifactorial, numerosos agentes se han invocado que "colaboran" simultánea y consecutivamente y contribuyen al surgimiento y desarrollo de la lesión aterosclerótica. La lesión ateromatosa es un sitio inflamatorio compuesto de un núcleo lipídico necrótico, el endotelio vascular modificado, células de músculo liso, macrófagos, linfocitos y gran variedad de mediadores inflamatorios.

Una gran variedad de factores de riesgo se conocen que están asociados a la aterosclerosis y a la patogénesis de la enfermedad cardiovascular. Los factores tales como el nivel de colesterol elevado, la hipertensión arterial, la hiperglicemia, el estrés, el hábito de fumar y la obesidad solo se encuentran en alrededor del 60 % de los casos. Nuestros resultados coinciden con este planteamiento. Debe señalarse que en el caso de los pacientes coronarios, sus factores de riesgo se encuentran compensados en su mayoría, por el fuerte control medicamentoso al que están sometidos, ya que son pacientes que llevan varios días de ingreso antes del tratamiento



quirúrgico, esto explica en parte su similitud con los valvulares.

En los últimos 15 años se comenzó a considerar la enfermedad aterosclerótica como una enfermedad crónica inflamatoria y se realizan nuevos esfuerzos desde entonces en la búsqueda de asociación con entidades infecciosas. La mayoría de los estudios citan a agentes de amplia distribución mundial, cuya infección es común (> 50% en mayores de 20 años), por sus características epidemiológicas y de infección a largo plazo a nivel celular, provocando repetidos estímulos antigénicos y una respuesta inmune con gran liberación de mediadores de la inflamación.

En Cuba existen pocos estudios previos de frecuencia de infección anterior frente al CMV y al VHS, dada por la presencia de anticuerpos IgG, en los que se encuentra una elevada frecuencia (entre el 75 y el 92%). Los resultados encontrados se encuentran en correspondencia con lo anterior.

La elevada frecuencia de infección por estos agentes debe ser considerada con sumo cuidado, pues existen múltiples estudios que tratan de establecer una relación etiológica entre estos agentes y el desarrollo de enfermedades tales como las enfermedades neurológicas, las autoinmunes y el envejecimiento inmunológico. Estos estudios tan variados conllevan a resultados encontrados, también con metodologías variables, en las que se asumen posiciones opuestas entre los investigadores, todo lo cual lo que no ha contribuido al esclarecimiento del papel real de estos agentes. Además esta situación es similar a la encontrada cuando se tratan de encontrar factores de riesgo asociados a la presencia de infecciones previas por estos agentes.

De ahí que para el establecimiento de la etiología infecciosa se debe tener en cuenta, además de la presencia de la infección anterior, la presencia del propio agente en sí en muestras del tejido afectado y los factores de riesgo asociados, estos elementos en un grupo control que valide los resultados encontrados. Razón por la cual decidimos recoger muestras de pacientes en los que en teoría no hubiera una enfermedad aterosclerótica avanzada, como es el caso de los pacientes con enfermedades valvulares; sin embargo los resultados no fueron estadísticamente diferentes entre los dos grupos de estudio.

La evidencia de la presencia de estos microorganismos en las lesiones ateroscleróticas ha emergido en múltiples estudios de los últimos años. La presencia ha sido determinada por varias técnicas, entre las que se incluyen la inmunohistoquímica, la microscopía electrónica, la hibridación y amplificación del ADN por PCR, la amplificación de ARNm y el cultivo de los microorganismos a partir de lesiones ateromatosas.

Existen investigadores que plantean que la elevada frecuencia de estos agentes infecciosos en las lesiones ateromatosas va acompañada con una notable ausencia de estos agentes en tejido vascular sano. Esta pudiera ser la explicación de que en el tejido de los pacientes incluidos en el estudio actual los autores de la presente investigación no encontraran el genoma de estos agentes, la elección de las muestras de tejido que se fueran a desechar o no se fueran a emplear en estos pacientes se realizó asumiendo el mínimo riesgo quirúrgico para estos, por lo que los tejidos no presentaban lesiones ateroscleróticas evidentes. Esta elección de tejidos constituye una ventaja para la evolución de los pacientes pero una limitante de la presente investigación.

CONSIDERACIONES FINALES

Se demuestra la asociación entre factores de riesgo conocidos en los pacientes con cardiopatía isquémica, además existe una elevada prevalencia serológica de exposición a los agentes infecciosos estudiados pero no se demuestra su presencia en los tejidos estudiados, en parte por lo explicado previamente. El presente estudio constituye el primer acercamiento a la búsqueda de asociación entre agentes infecciosos y la enfermedad aterosclerótica en Cuba. Quedaría pendiente realizar la valoración de realizar un nuevo estudio en pacientes cuyas muestras de tejido provengan de lesiones ateroscleróticas y realizar estas mismas determinaciones y poder comprobar así si se trata de una asociación irrefutable lo encontrado por otros autores a nivel internacional. Un probable y futuro grupo de pacientes a estudiar podrían ser los pacientes candidatos a realizar una endarterectomía.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bess Constantén S. Anuario Estadístico de Salud. In: Cuba DNdRM y EdSd, editor. La Habana: Ministerio de Salud Pública; 2013.



2. Ji YN, An L, Zhan P, Chen XH. Cytomegalovirus infection and coronary heart disease risk: a meta-analysis. *Mol Biol Rep.* 2012;39:6537-46.
3. Hechter RC, Budoff M, Hodis HN, Rinaldo CR, Jenkins FJ, Jacobson LP, et al. Herpes simplex virus type 2 (HSV-2) as a coronary atherosclerosis risk factor in HIV-infected men: Multicenter AIDS Cohort Study. *Atherosclerosis.* 2012;223:433-6.
4. Borel N, Pospischil A, Dowling RD, Dumrese C, Gaydos CA, Bunk S, et al. Antigens of persistent Chlamydia pneumoniae within coronary atheroma from patients undergoing heart transplantation. *J Clin Pathol.* 2012;65:171-7
5. Folsom AR, Nieto FJ, Sorlie P, Chambless LE, Graham DY. Helicobacter pylori seropositivity and coronary heart disease incidence. *Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) Study Investigators. Circulation.* 1998;98:845-50.
6. Corrado E, Novo S. Role of inflammation and infection in vascular disease. *Acta Chir Belg.* 2005;105:567-79.
7. Mocarski ES, Shenk T, Pass RF. Cytomegaloviruses. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology.* Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 2703-72.
8. Roizman B, Knipe DM, Whitley RJ. Herpes Simplex Viruses. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology.* Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 2503-601.
9. Al-Ghamdi A, Jiman-Fatani AA, El-Banna H. Role of Chlamydia pneumoniae, helicobacter pylori and cytomegalovirus in coronary artery disease. *Pak J Pharm Sci.* 2011;24:95-101.
10. Kurano M, Tsukamoto K. Etiology of atherosclerosis-- special reference to bacterial infection and viral infection. *Nihon Rinsho.* 2011;69:25-9.
11. Belland RJ, Ouellette SP, Gieffers J, Byrne GI. Chlamydia pneumoniae and atherosclerosis. *Cell Microbiol.* 2004;6:117-27.
12. Resik S, Enamorado A, Tallo Y, Suarez C, Kouri V, Acosta B, et al. Prevalence of antibodies against herpes simplex virus, Epstein-Barr virus and cytomegalovirus in a group of patients after hemodialysis. *Rev Cubana Med Trop.* 1999;51:172-6.
13. Correa CB, Kourí V, Verdasquera D, Martínez PA, Álvarez A, Aleman Y, et al. HCMV seroprevalence and associated risk factors in pregnant women, Havana City, 2007 to 2008. *Prenatal Diagn.* 2010;30:888-92.
14. Alvarez R, Cour I, Kanaan A, Benedicto M, Martín-Estefanía C, Arroyo R, et al. Detection of viral genomes of the Herpesviridae family in multiple sclerosis patients by means of the polymerase chain reaction (PCR). *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2000;18:223-8.
15. Le Saux S, Weyand CM, Goronzy JJ. Mechanisms of immunosenescence: lessons from models of accelerated immune aging. *Ann N Y Acad Sci.* 2012;1247:69-82.

Recibido: 1-02-2015
Aceptado: 15-04-2015

