

## *Mycoplasma pneumoniae* y *Chlamydia pneumoniae* se asocian con la inflamación y la rotura de las placas coronarias ateroscleróticas

José Antonio F. Ramires y Maria de Lourdes Higuchi

Heart Institute (InCor), University of São Paulo. Medical School. São Paulo. Brasil.

En la presente revisión describimos nuestros hallazgos recientes de laboratorio que demuestran que *Mycoplasma pneumoniae* y *Chlamydia pneumoniae* están presentes en cantidades elevadas, asociados con la inflamación de la adventicia y el remodelado positivo del vaso, en segmentos de la arteria coronaria (SAC) trombosados de pacientes que fallecieron debido a un infarto agudo de miocardio. Los linfocitos predominantes en la placa fueron linfocitos T CD8, y en la adventicia linfocitos B CD24. El número medio de linfocitos fue significativamente mayor en la adventicia que en la placa. Las placas vulnerables se asociaron habitualmente con un remodelado positivo focal del vaso y extensos ateromas lipídicos. *Mycoplasma* es la única bacteria que necesita colesterol para proliferar. Formulamos la hipótesis de que la asociación de *Mycoplasma pneumoniae* y *Chlamydia pneumoniae* aumenta la virulencia de ambas bacterias, induciendo la inflamación y la rotura de la placa. La búsqueda de citomegalovirus y *Helicobacter pylori* fue negativa.

**Palabras clave:** Aterosclerosis coronaria. Infección. Inflamación. Síndromes coronarios agudos. Fisiopatología.

### ***Mycoplasma Pneumoniae* and *Chlamydia Pneumoniae* are associated to inflammation and rupture of the atherosclerotic coronary plaques**

In this review we report recent findings of our lab showing that *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* are present in higher amount, associated with adventitial inflammation and positive vessel remodeling, in thrombosed coronary artery segments (CAS) of patients who died due to acute myocardial infarction. CD8T cell was the predominant lymphocytes in the plaque and CD24(B) cell in the adventitia. The mean numbers of lymphocytes were significantly higher in adventitia than in the plaque. Vulnerable plaques were usually associated with focal positive vessel remodeling and large lipidic atheromas. *Mycoplasma* is the only bacterium that needs cholesterol for proliferation. We hypothesized that the association of *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* increases virulence of both bacteria, inducing inflammation and rupture of the plaque. The search of CMV and *Helicobacter pylori* resulted negative.

**Key words:** Coronary atherosclerosis. Infection. Inflammation. Acute coronary syndromes. Pathophysiology.

## INTRODUCCIÓN

Numerosos estudios han tratado de asociar los agentes infecciosos en el desarrollo de la aterosclerosis y el infarto agudo de miocardio<sup>1,2</sup>, principalmente *Chlamydia pneumoniae*<sup>3-6</sup>. Sin embargo, los resultados son controvertidos<sup>7,8</sup> y los datos serológicos no pueden discriminar a pacientes que desarrollarán un infarto agudo de miocardio (IAM)<sup>9</sup>. Se acepta que en la placa aterosclerótica la inflamación se relaciona con la ines-

tabilidad de la placa<sup>10-12</sup>. Los factores de riesgo tradicionales sólo se asocian en algunos de los pacientes que experimentan infarto de miocardio. Un valor sanguíneo elevado de colesterol parece ser el hallazgo asociado más frecuente, y lo que resulta difícil de explicar es la razón de que el colesterol induzca inflamación. Por otra parte, la progresión acelerada de aterosclerosis en algunas enfermedades reumáticas autoinmunes, como el lupus eritematoso sistémico, el síndrome antifosfolipídico, la artritis reumatoide y la vasculitis, ha dado lugar a que los autores atribuyan el desarrollo de aterosclerosis a mecanismos autoinmunes<sup>13</sup>.

Por consiguiente, llevamos a cabo una serie de estudios analizando en profundidad las características histopatológicas de placas que experimentaron rotura y las comparamos con placas estables del mismo o diferentes pacientes, con el objetivo de estudiar los com-

La presente investigación ha sido financiada por becas de la Fundação Zerbini y FAPESP.

Correspondencia: Dr. J.A.F. Ramires, MD, PhD, FESC.  
Clinical Division. Heart Institute (InCor).  
University of São Paulo Medical School.  
Av. Dr. Eneas C. Aguiar, 44.  
CEP-05403-900 São Paulo SP. Brasil.  
Correo electrónico: jramires@incor.usp.br

ponentes y el tamaño de la placa, el remodelado de la pared y de la placa y la inflamación de la adventicia. También investigamos la presencia de algunos agentes infecciosos, utilizando diferentes técnicas (inmunohistoquímica, hibridación *in situ* y microscopía electrónica) con el objetivo de confirmar la fiabilidad de los resultados.

### Rotura y remodelado de la placa

Diversas pruebas clínicas ponen de manifiesto que el IAM frecuentemente tiene lugar en puntos con un grado de estenosis coronaria de leve a moderada. El grado de estenosis luminal no sólo depende del depósito de placa sino también del tipo y el grado de remodelado de los vasos<sup>14,15</sup>. La angiografía coronaria no puede evaluar la cantidad de placa y el remodelado de los vasos. Algunos estudios recientes llevados a cabo con ecografía intravascular han documentado diferentes tipos de remodelado vascular en placas de composición y presentación clínica diversas<sup>16-18</sup>. Estos estudios han sugerido que un remodelado positivo se asocia con placas vulnerables, y un remodelado negativo con placas estables. En el presente estudio *post mortem*, probamos cuantitativamente la hipótesis de que el tamaño del ateroma coronario y el tipo de remodelado distinguen una lesión responsable de IAM fatal de una lesión equiestenótica en el mismo árbol coronario.

Se estudiaron histológicamente las principales ramas coronarias de 36 pacientes consecutivos con IAM fatal. Se compararon la lesión (grupo A) responsable de oclusión vascular e IAM fatal, y una placa estable equiestenótica (determinada histológicamente) (grupo B), obtenida en otra rama coronaria del mismo paciente. Las determinaciones morfométricas incluyeron áreas (tabla 1) de la luz, el remodelado de la placa, del vaso y el vascular, determinado mediante el área transversal relativa del vaso (área de lesión del vaso/área de referencia del vaso) 100%. El remodelado positivo se definió como un área relativa del vaso > 105%, y el remodelado negativo como un área relativa del vaso < 95%. La determinación de la composición de la placa incluyó las áreas porcentuales ocupadas por fibrosis, lípidos, macrófagos (CD68) y células musculares lisas (HHF 35). Comparado con el grupo B, en el grupo A se identificaron mayores áreas de placa (media ± DE): 9,6 ± 1,5 frente a 4,7 ± 2,3 mm<sup>2</sup>, vaso 12,7 ± 4,9 frente a 7,4 ± 3 mm<sup>2</sup> y luz 1,7 ± 1,5 frente a 1,2 ± 0,86 mm<sup>2</sup> (p < 0,01). El remodelado positivo fue más frecuente en el grupo A que en el grupo B: 21/30 (70%) frente a 8/26 (31%). El área de la placa se correlacionó positivamente con el área porcentual de lípidos (r = 0,68; p < 0,01) y con el área porcentual de macrófagos (r = 0,41; p < 0,01). El área de la placa se relacionó negativamente con el área porcentual de fibrosis (r = -0,64; p < 0,01) y con el área porcentual de células musculares lisas (r = -0,48; p < 0,01). El remodelado negativo

TABLA 1. Áreas transversales medias (mm<sup>2</sup>) de segmentos de la arteria coronaria con lesiones ateroscleróticas estables e inestables

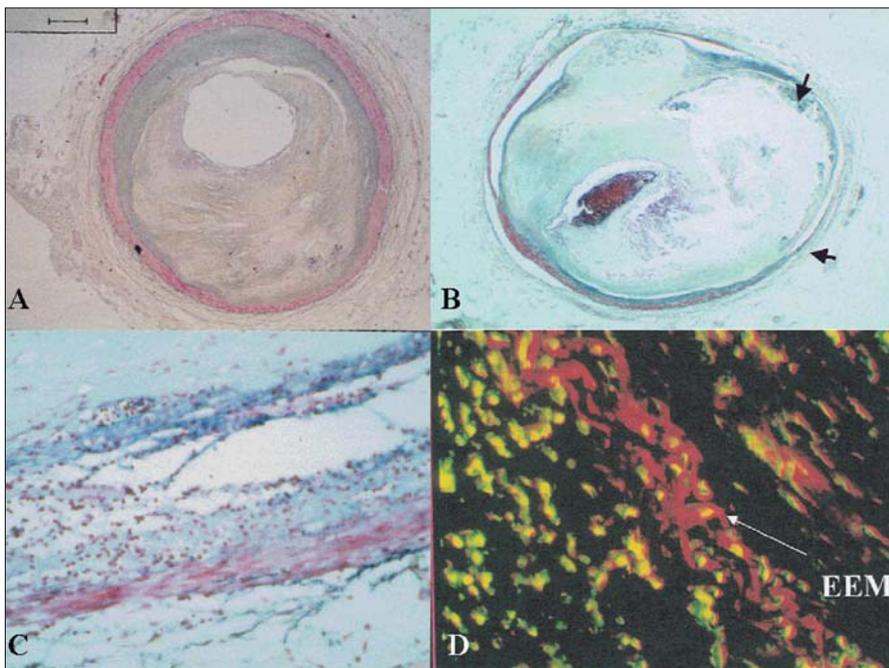
	Grupo A (inestable)	Grupo B (estable)	p
Área transversal arteria coronaria (a partir MEE)	13,8 ± 4,8	7,6 ± 3,0	< 0,001
Área de placa (rodeada de MEI)	9,8 ± 4,8	4,8 ± 2,3	< 0,001
Área de placa sin área de lípidos	5,9 ± 2,4	4,4 ± 1,8	< 0,01

MEE: membrana elástica externa; MEI: membrana elástica interna.

estuvo presente en el 19% del grupo B y solamente en el 3% del grupo A (figs. 1A y B).

En este estudio concluimos que las placas ateroscleróticas que inducen trombosis e IAM fatal se remodelan positivamente de forma más frecuente y tienen tendencia a ser de mayor tamaño que las placas estables.

Al analizar 34 de los 36 segmentos de la arteria coronaria (SAC) examinados en el estudio descrito previamente, valoramos si la inflamación de la adventicia se asociaría con un remodelado positivo, una menor fibrosis de la adventicia y la atenuación de la capa media en placas vulnerables. Como se ha descrito previamente, la lesión responsable (grupo A) y un segmento equiestenótico no responsable (grupo B) obtenido en las determinaciones de otra rama coronaria del mismo paciente se compararon de acuerdo con el número medio de linfocitos presentes en la adventicia y dentro de las placas. También llevamos a cabo un recuento de los microvasos adventicios, determinamos la fibrosis adventicia y, utilizando microscopía láser confocal, analizamos la membrana elástica externa<sup>19,20</sup>. Obtuvimos los resultados siguientes (tabla 2): en la adventicia, las cantidades de linfocitos y microvasos/mm<sup>2</sup> fueron, respectivamente, de 69,5 ± 88,3 y 60,9 ± 32,1 en las lesiones responsables, y de 16,4 ± 21,1 y 43,3 ± 16,1 en las lesiones estables (linfocitos p < 0,01; microvasos, p = 0,04). Los linfocitos más numerosos en la adventicia fueron los linfocitos B CD20. Dentro de las placas, el número medio de linfocitos totales fue de 24,0 ± 40,8 en las lesiones responsables y de 10,9 ± 13,2 en las estables (p = 0,17) y se identificó una diferencia significativa en los linfocitos T CD4: 6,2 ± 7,0 frente a 3,4 ± 4,1 (p < 0,05); los linfocitos más numerosos presentes en la placa fueron linfocitos T CD8. El área porcentual media de fibrosis adventicia del área transversal del vaso fue significativamente menor en las placas inestables (16,24 ± 5,07 frente a 28,95 ± 9,76%, respectivamente; p < 0,001) (figs. 1C y D). Estos hallazgos sugieren convincentemente que la inflamación crónica es responsable de la destrucción de la capa media y el colágeno de la adventicia, contribuyendo a un remodelado positivo.



**Fig. 1.** A) Ejemplo de rotura de una placa trombosada de un paciente que falleció debido a un infarto agudo de miocardio, en la que se detectó un remodelado positivo asociado con un adelgazamiento de la media y una menor fibrosis adventicia. B) Correspondiente placa estable equiestenótica, en la que se identifica una capa media preservada y un menor remodelado positivo. C) Importante inflamación presente en la base de la placa, la capa media y la adventicia. D) Las imágenes confocales destacan la destrucción de la membrana elástica externa asociada con células inflamatorias.

Podemos establecer las siguientes conclusiones: las placas inestables manifiestan hallazgos de panarteritis crónica, acompañada de un engrosamiento, así como de un adelgazamiento de la media, y menos fibrosis que en las lesiones estables equiestenóticas. La inflamación de la adventicia contribuiría de manera importante a la inestabilidad del ateroma.

### Relación entre *Chlamydia pneumoniae* y la rotura de la placa

A pesar del número cada vez mayor de artículos que tratan de clarificar si *C. pneumoniae* participa en la patogenia de la rotura de la placa y el IAM, sigue siendo un aspecto no dilucidado. La mayoría de los artículos ya publicados no cuantifican la cantidad de bacterias presentes en las lesiones (sólo si están presentes o no) y tampoco incluyen placas trombosadas que han experimentado rotura<sup>21-26</sup>. Como hemos demostrado, las

placas vulnerables son las placas asociadas en realidad con la inflamación y el remodelado positivo y, por consiguiente, es preciso incluirlas. En esta parte de la presente revisión, describiremos nuestros hallazgos recientes sobre este tema, demostrando que las placas vulnerables presentan un elevado número de células infectadas por *C. pneumoniae* presente en la placa y en la adventicia.

En una comunicación breve previa<sup>27</sup> y en un artículo no publicado, estudiamos los SAC trombosados responsables de IAM fatal y los comparamos con placas estables y SAC no ateroscleróticos. En todos los casos se identificó la presencia de *C. pneumoniae* en la adventicia, con independencia de la presencia de aterosclerosis, aunque en mayor cantidad en los segmentos de placa trombosados que habían experimentado rotura.

Se analizaron 68 SAC de pacientes fallecidos en el Heart Institute (InCor) de la University of São Paulo Medical School. La búsqueda de células positivas para

**TABLA 2. Número medio de linfocitos en las placas ateroscleróticas de la íntima y la adventicia de segmentos ateroscleróticos coronarios estables e inestables de los mismos individuos**

Linfocitos/mm <sup>2</sup>	Placa adventicia		Placa íntima	
	Lesión inestable (n = 34)	Lesión estable (n = 34)	Lesión inestable (n = 34)	Lesión estable (n = 34)
CD20-B <sup>a,c</sup>	34,0 ± 58,1	5,9 ± 3,2	5,4 ± 16,7	1,9 ± 4,4
CD8-T <sup>a</sup>	20,5 ± 30,3	5,0 ± 5,7	13,6 ± 23,4	5,6 ± 7,5
CD4-T <sup>a,b</sup>	16,2 ± 19,4	5,8 ± 7,8	6,2 ± 7,0	3,4 ± 4,1
Total <sup>a,b,c</sup>	69,5 ± 88,3	16,4 ± 21,2	24,0 ± 40,8	10,9 ± 13,2

<sup>a</sup>Las diferencias entre las lesiones inestables y estables en la adventicia son significativas. <sup>b</sup>Las diferencias entre las lesiones inestables y estables en la placa de la íntima son significativas. <sup>c</sup>Las diferencias entre las placas de la adventicia y de la íntima en las lesiones inestables son significativas. Ninguna otra diferencia fue significativa.

**TABLA 3. Frecuencia y cantidad de células positivas para *C. pneumoniae* en segmentos inestables o estables o no ateroscleróticos de arteria coronaria**

	Grupo A Lesiones inestables	Grupo B Placas estables	Grupo C Placas estables	Grupo D Sin ateroma
<i>C. pneumoniae</i> + segmentos en la arteria coronaria (%)				
Adventicia	100%	91%	82%	82%
Placa	96%	83%	82%	100%
<i>C. pneumoniae</i> + células/mm <sup>2</sup> (número mediano)				
Adventicia	6,19	0,67	1,11	0,17
Placa	2,33	0,27		

A: placa que experimentó rotura a partir de pacientes que fallecieron de infarto agudo de miocardio; B: placas estables a partir de pacientes del grupo A; C: placas estables a partir de pacientes que fallecieron sin IAM; D: segmentos de arteria coronaria a partir de pacientes sin aterosclerosis.

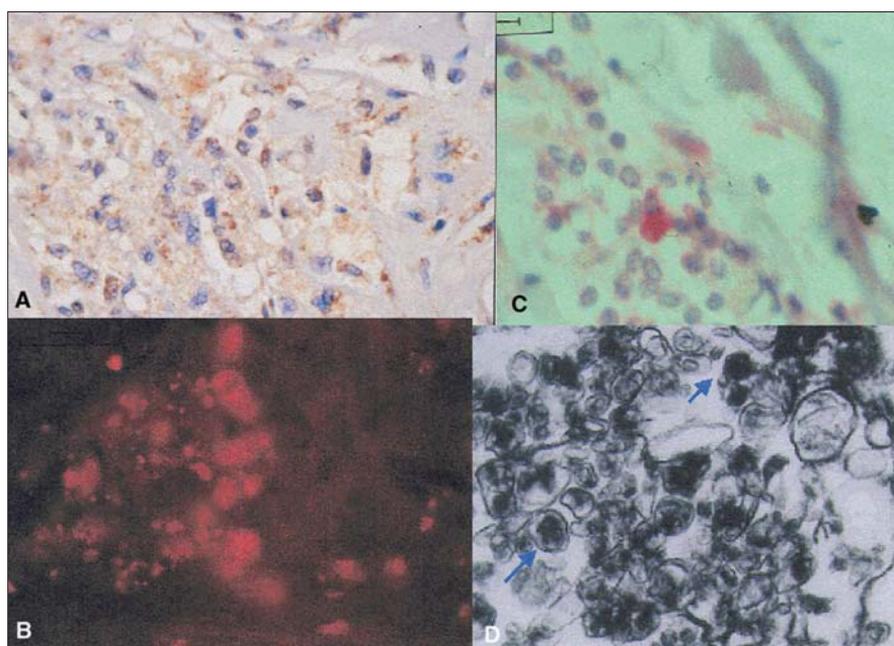
*C. pneumoniae* se llevó a cabo utilizando una tinción de Macchiavello, inmunohistoquímica, hibridación *in situ*, microscopía electrónica y microscopía confocal. Se llevó a cabo un recuento de células positivas para *C. pneumoniae* en portas inmunoteñidos. Los SAC se dividieron en 4 grupos (tabla 3): grupo A (placa que experimentó rotura fatal a partir de 23 pacientes con IAM); grupo B (23 placas equiestenóticas que no experimentaron rotura a partir de pacientes del grupo A); grupo C (placa ateromatosa estable a partir de 11 pacientes sin IAM), y grupo D (segmentos no ateroscleróticos de la arteria coronaria a partir de 11 pacientes).

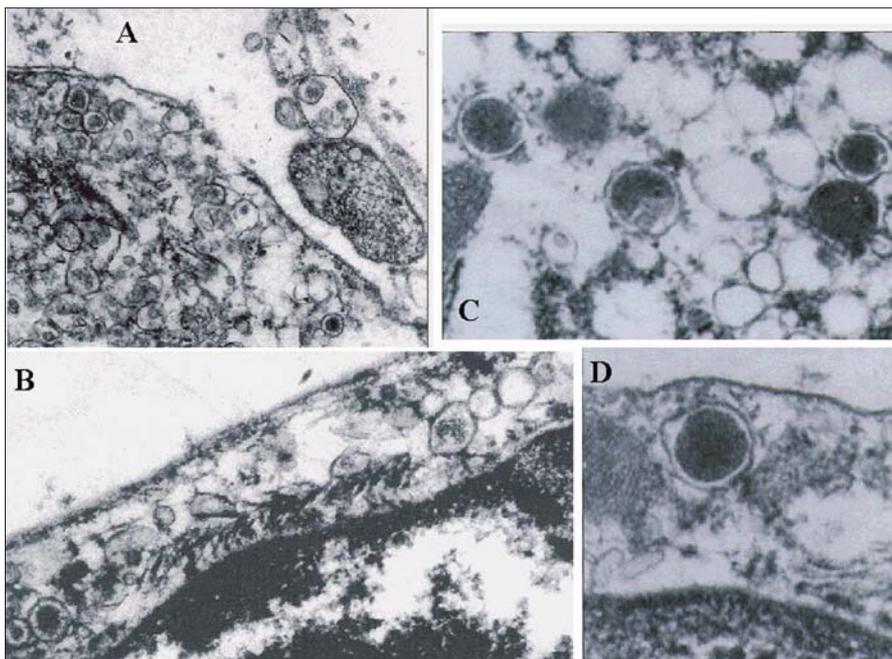
Mediante análisis de los portas inmunoteñidos, se obtuvo el número medio de células positivas para *C. pneumoniae*/400 campo. Como controles positivos se utilizaron un segmento de placa que experimentó rotura, en la que se detectó un número elevado de células positivas para *C. pneumoniae* en el examen con microscopio electrónico, y un bloque de parafina de pulmón de conejo infectado por *C. pneumoniae*. Se obtu-

vieron los siguientes resultados: en la adventicia y en la íntima de casi todos los grupos estuvieron presentes cuerpos positivos para *C. pneumoniae*, detectándose mediante inmunohistoquímica, inmunofluorescencia (imágenes de láser confocal), hibridación *in situ* y microscopía electrónica. La cuantificación se llevó a cabo en portas teñidos con inmunohistoquímica (fosfatasa alcalina) y puso de manifiesto que el número medio de células positivas para *C. pneumoniae* fue significativamente mayor en el grupo A (figs. 2 y 3). Entre los grupos B, C y D no se identificaron diferencias en la cantidad de células positivas para *C. pneumoniae*.

Como conclusión podemos establecer que *C. pneumoniae* se identifica frecuentemente en la adventicia de SAC ateroscleróticos y no ateroscleróticos. Una mayor cantidad de esta bacteria se asocia con las características histopatológicas de inestabilidad de la placa. Estos hallazgos favorecen el concepto de que *C. pneumoniae* contribuye al desarrollo de inestabilidad de la placa.

**Fig. 2.** A) Tejido de granulación en una placa vulnerable que contenía diversos fibroblastos y macrófagos densamente positivos para ADN-*C. pneumoniae* mediante hibridación *in situ*. B) Células positivas rosadas para los antígenos de *C. pneumoniae* en la adventicia mediante una técnica de inmunohistoquímica. C) Inmunofluorescencia frente a los antígenos de *C. pneumoniae* en una placa que ha experimentado rotura. D) Microscopía electrónica de un segmento vulnerable que contiene grandes cantidades de cuerpos de *C. pneumoniae* en la placa.





**Fig. 3.** Diferentes aspectos en microscopía electrónica de los cuerpos de *C. pneumoniae* en la célula endotelial de los microvasos de la adventicia y en los macrófagos.

### Asociación entre *Mycoplasma pneumoniae* y *Chlamydia pneumoniae* en la placa que experimenta rotura

Después de nuestros hallazgos de que *C. pneumoniae* está presente con una elevada frecuencia en la adventicia de SAC y que se observa en número elevado en segmentos inestables, asociada con una inflamación aguda y un remodelado positivo, examinamos nuevos elementos que pudieran inducir la proliferación de *C. pneumoniae*. Revisando las muestras examinadas con microscopía electrónica, detectamos una bacteria diferente en la matriz extracelular, cerca de los cuerpos de *C. pneumoniae*. Esta bacteria carece de pared externa y la única bacteria que presenta dicha característica es *Mycoplasma*. Por consiguiente, utilizando hibridación *in situ*, identificamos que este microorganismo era *M. pneumoniae*.

Dicho hallazgo se describió en una comunicación breve: la demostración mediante microscopía electrónica e hibridación *in situ* de la asociación entre *M. pneumoniae* y *C. pneumoniae* en SAC trombados<sup>28</sup>. Es bien conocido que *Mycoplasma* es la única bacteria que requiere colesterol en su membrana y para su proliferación<sup>29</sup>. Recientemente, se ha sugerido una posible asociación entre *M. pneumoniae* y la aterosclerosis, partiendo de pruebas serológicas indirectas<sup>30</sup>. Sin embargo, se ha considerado que *Mycoplasma* es un parásito típico del epitelio (vías respiratorias y tracto genitourinario). Se considera que *Mycoplasma* no es capaz de invadir el cuerpo humano. Nuestro informe fue el primero que demostró que las paredes de los vasos son un hábitat usual de *Mycoplasma*.

### MATERIAL Y MÉTODOS

En este estudio se utilizaron los cortes seriados de los mismos 68 SAC descritos en el estudio sobre *C. pneumoniae*.

También se llevó a cabo un estudio con microscopía electrónica en 4 muestras transversales adicionales.

En un caso del grupo A, se llevó a cabo una doble tinción para la detección simultánea de *Chlamydia pneumoniae* (mediante técnica de inmunohistoquímica) utilizando como cromógeno fosfatasa alcalina, y *M. pneumoniae* mediante la técnica de hibridación *in situ*.

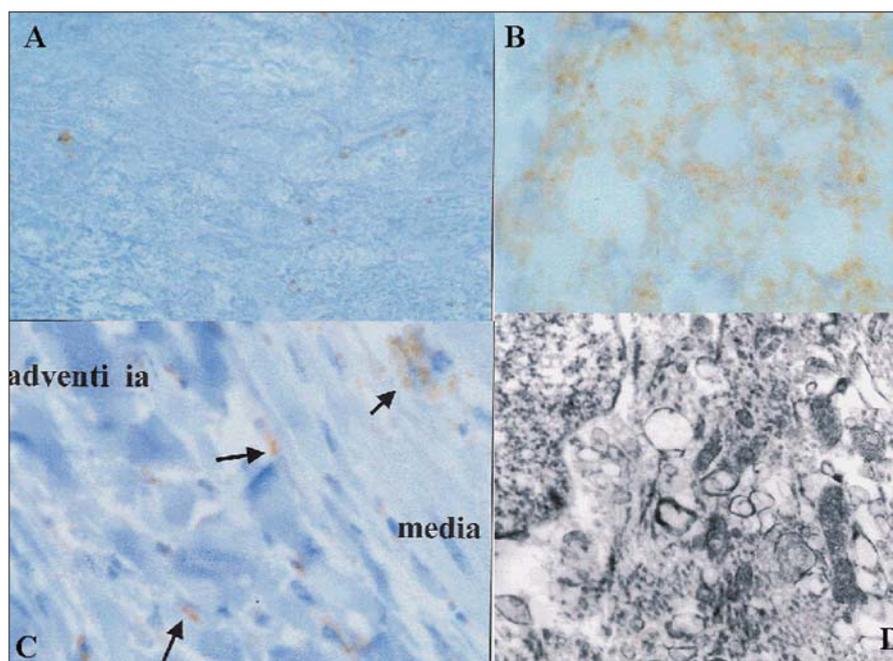
La cantidad de *M. pneumoniae* de los casos A y B se comparó con la cantidad de células positivas para *Chlamydia pneumoniae*, el número de linfocitos T CD4 y CD8 y linfocitos B CD20, y el área de grasa dentro de las placas ateroscleróticas<sup>28</sup>.

Se llevaron a cabo controles negativos omitiendo la sonda o el anticuerpo primario. Como control positivo para todas las reacciones, utilizamos un tejido humano conocido previamente por ser positivo para *Mycoplasma pneumoniae*. Adicionalmente, para la hibridación *in situ* utilizamos una sonda alu repetitiva marcada con biotina (secuencia alu 1/alu 2) (Research Genetics, A1, EE.UU.) como control positivo para la técnica y una sonda plásmido ADN/biotinilada como control negativo (Dako, Carpintería, Ca, EE.UU.).

### RESULTADOS

#### Hibridación *in situ*

Se detectó *C. pneumoniae* como pequeños gránulos parduscos positivos en el área de grasa de las placas (fig. 4), principalmente en las inestables (grupo A).



**Fig. 4.** A) y B) Menos *M. pneumoniae* entre el tejido fibroso de una placa estable. C) También se detectó *M. pneumoniae* en la media y la adventicia, habitualmente en las formas más extensas de estos segmentos de la arteria coronaria. D) Núcleo lipídico necrótico de una placa vulnerable en la que se detectan numerosos micoplasmas entre diversas estructuras membranosas que representarían la bacteria degenerada.

En los segmentos estables (grupos B y C), se detectó una menor cantidad de *M. pneumoniae* en la placa (fig. 4A) mientras que en la media prácticamente estaba ausente y en la adventicia estaba ausente o se detectó en pequeña cantidad.

En el grupo D (grupo no aterosclerótico), *M. pneumoniae* estaba ausente o se detectaron cantidades muy pequeñas en el espacio subendotelial.

### Morfometría y comparación con el número de *Chlamydia pneumoniae*, número de linfocitos y porcentaje de grasa

En la tabla 4 se incluye el área porcentual de *M. pneumoniae* y el número medio de células positivas para *C. pneumoniae* (grupos A, B, C y D), el área porcentual de grasa y el número medio de linfocitos/mm<sup>2</sup> (grupos A y B).

El área porcentual ocupada por *M. pneumoniae* fue significativamente mayor en el grupo A (rotura de la placa) que en el grupo B (placas estables del mismo paciente) ( $p < 0,01$ ). En los grupos B y C se observó una distribución similar que fue mucho mayor que en el grupo D no aterosclerótico.

Analizando las placas estables y que experimentaron rotura a partir de los grupos A y B, se obtuvo una correlación significativa (prueba de Pearson) entre el área porcentual ocupada por *M. pneumoniae* en la placa y el área porcentual de grasa en la placa ( $r = 0,69$ ). Se identificó una importante correlación con el número medio de linfocitos T CD4+ ( $r = 0,37$ ), linfocitos T CD8+ ( $r = 0,37$ ) y linfocitos B CD20+ ( $r = 0,018$ ).

### Microscopia electrónica

Confirmando los resultados de la inmunohistoquímica y la hibridación *in situ* descritos previamente, se observó una gran cantidad de *C. pneumoniae* en los segmentos inestables en el interior de los monocitos sanguíneos, los macrófagos intersticiales, las células musculares lisas y los fibroblastos. También se detectaron otras formas de bacterias con un tamaño similar a *C. pneumoniae* pero diferentes desde un punto de vista morfológico (fig. 4D). Pudieron identificarse como *Mycoplasma* por sus características morfológicas las pequeñas estructuras redondeadas, de 0,1 a 0,4  $\mu$ m de diámetro, que carecían de pared externa y contenían material granulado similar a la cromatina. Se

**TABLA 4. Cantidad de *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, linfocitos y grasa en las placas de diferentes grupos**

Grupo	Área porcentual de <i>M. pneumoniae</i>	Número medio <i>C. pneumoniae</i>	Número medio de linfocitos/mm <sup>2</sup>	Área porcentual de grasa
A	32,5 ± 14,76	35,36 ± 9,30	16,94 ± 9,16	44,2 ± 21,68
B	9,99 ± 6,05	11,93 ± 23,4	6,00 ± 7,48	3,47 ± 6,26
C	12,15 ± 8,12	24,00 ± 47,71	NR	NR
D	0,62 ± 0,60	3,00 ± 2,57	NR	NR

NR: no realizado.

puso de manifiesto que estaban adheridas a los *vasa vasorum* de las células endoteliales y, dentro de las células endoteliales, en el intersticio y en el citoplasma de los macrófagos, habitualmente cerca de los cuerpos de *C. pneumoniae*. Dentro de las placas de grasa, *Mycoplasma* se caracterizó por una forma redondeada y pequeño tamaño, entre el material ateromatoso necrótico; en la capa media y la adventicia habitualmente se detectaron en formas más extensas, cilíndricas, que contenían un mayor número de gránulos densos al microscopio electrónico recubiertos de una envoltura de membrana exclusiva.

En los segmentos de placa estable se identificó una menor cantidad de *M. pneumoniae*, y en la adventicia se detectaron formas mayores con gránulos densos al microscopio electrónico.

## DISCUSIÓN

Es bien conocido que *Mycoplasma* es el microorganismo más pequeño caracterizado por autorreproducción<sup>14</sup>. Para sobrevivir, requiere colesterol ya que su membrana externa está constituida por esta sustancia, una propiedad exclusiva entre las procariontes<sup>14</sup>. Se ha descrito una asociación con *C. pneumoniae* en infecciones respiratorias<sup>31,32</sup>. Se ha considerado un parásito de las superficies epiteliales.

En el presente estudio, identificamos que *M. pneumoniae* está presente en todas las áreas de grasa de ateroma, principalmente en la placa vulnerable, ya que suelen ser más ricas en colesterol. También detectamos mayores cantidades de *M. pneumoniae* en asociación con la inflamación intraplaca elevada, principalmente debido a linfocitos T CD8. Es bien conocido que *M. pneumoniae* induce una ligera respuesta inmune constituida básicamente por linfocitos T<sup>33</sup>. *M. pneumoniae* también explicaría el elevado número de células musculares lisas apoptóticas y macrófagos espumosos de las placas inestables<sup>34</sup>, ya que los micoplasmas son capaces de oxidar la membrana celular del huésped induciendo su apoptosis<sup>35</sup>. Adicionalmente, es bien conocido que los micoplasmas dan lugar a un aumento de la producción de citocinas por las células inflamatorias<sup>36</sup>, lo que explicaría la mayor concentración de citocinas observada habitualmente en las placas vulnerables<sup>37</sup>.

En las placas inestables se observó una asociación significativa entre un número elevado de células positivas para *C. pneumoniae* y una cantidad elevada de *M. pneumoniae* ( $p < 0,05$ ).

*Mycoplasmas* y *Chlamydias* degenerados explicarían el mayor número de componentes de membrana observado en los ateromas<sup>38,39</sup>.

Algunos estudios han demostrado que *Mycoplasma* induce una mayor virulencia de otros microorganismos<sup>40</sup>. Utilizando técnicas de doble tinción (reacción inmunohistoquímica frente a *C. pneumoniae* e hibrida-

ción *in situ* frente a *M. pneumoniae*) confirmamos el hallazgo de microscopía electrónica de células coinfectadas. Recientemente, ciertos hallazgos serológicos han indicado una correlación entre anticuerpos frente a *M. pneumoniae* y la aterosclerosis coronaria<sup>15</sup>.

Se ha sugerido que *Mycoplasma* participa en un elevado número de enfermedades humanas, como las neumonías, la artritis y la uretritis<sup>41</sup>, la progresión del sida, el síndrome de fatiga crónica, síndrome del distrés respiratorio agudo, etc.<sup>42</sup>. Estas ideas proceden de los hallazgos serológicos o del cultivo en algunos de los casos publicados.

No pudimos determinar cómo alcanzan el espacio subendotelial. ¿Son capaces de inducir una disfunción endotelial que favorecería la entrada de LDL en la placa? ¿Estarían presentes en la pared de la íntima y proliferarían en presencia de colesterol? Algunos aspectos que detectamos con microscopía electrónica, como las pequeñas estructuras similares a *Mycoplasma* en íntimo contacto con las células endoteliales, favorecerían el concepto de que alcanzan el espacio subendotelial a partir de la sangre. *Mycoplasma* posee lipoproteínas ancladas en la cara externa de su membrana plasmática, lo que se supone que es un mecanismo de evasión eficaz a partir del sistema de defensa inmune del huésped<sup>43</sup>.

En conclusión, describimos una serie de estudios que favorecen convincentemente el concepto de que la aterosclerosis y la rotura de la placa son complicaciones asociadas con agentes infecciosos. *M. pneumoniae* está presente en casi todos los ateromas coronarios. Su asociación con *C. pneumoniae* explicaría la mayor cantidad de *C. pneumoniae*, la inflamación y la inestabilidad de la placa. La gran cantidad de *C. pneumoniae* presente en los fibroblastos de la adventicia y las células musculares lisas es compatible con la hipótesis de que esta bacteria también favorecería el remodelado positivo del vaso<sup>9</sup>.

También especulamos que las células musculares lisas, los fibroblastos y la fibrosis que forman el ateroma podrían ser una reacción inmune del huésped, circunscribiendo los agentes infecciosos. La inflamación en la placa y la apoptosis de los componentes de la cápsula que intervienen en la patogenia de la rotura de la placa estarían influidas por la presencia de *Mycoplasma*.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Wanishsawad C, Zhou YF, Epstein SE. *Chlamydia pneumoniae*-induced transactivation of the major immediate early promoter of clomegalovirus: potential synergy of infectious agents in the pathogenesis of atherosclerosis. *J Infect Dis* 2000;181:787-90.
2. Van der Wal AC, Piek JJ, de Boer OJ, Koch KT, Teeling P, Van der Loos CM, et al. Recent activation of the plaque immune response in coronary lesions underlying acute coronary syndromes. *Heart* 1998;80:14-8.
3. Maass M, Bartels C, Kruger S, Krause E, Engel PM, Dalhoff K. Endovascular presence of *C. pneumoniae* DNA is a generalized

- phenomenon in atherosclerotic vascular disease. *Atherosclerosis* 1998;140(Suppl 1):25-30.
4. Higuchi M, Castelli JB, Aiello VD, Palomino S, Reis MM, Sambiasi NV, et al. Great amount of *C. pneumoniae* in ruptured plaque vessel segments at autopsy. A comparative study of stable plaques. *Arq Bras Cardiol* 2000;74:149-51.
  5. Shor A, Phillips J. *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis. *JAMA* 1999;282:2071-3.
  6. Saikku P, Leinonen M, Mattila K, Ekman MR, Nieminen MS, Makela PH, et al. Serologic evidence of an association of a novel *Chlamydia*. TWAR with coronary artery disease and acute myocardial infarction. *Lancet* 1988;2:983-6.
  7. Thomas M, Wong Y, Ajaz M, Tsang V, Gallagher PJ, Ward ME. Relation between direct detection of *Chlamydia pneumoniae* DNA in human coronary arteries at postmortem examination and histological severity (Stary gradilg) of associated atherosclerotic plaque. *Circulation* 1999;99:2733-6.
  8. Ericson K, Saldeen TGP, Lindquist O, Pahlson C, Mehta JL. Relationship of *Chlamydia pneumoniae* infection to severity of human coronary atherosclerosis. *Circulation* 2000;101:2568-71.
  9. Glader CA, Boman J, Saikku P, Stenlund H, Weinehall L, Hallmanns G, et al. The proatherogenic properties of lipoprotein(a) may be enhanced through the formation of circulating immune complexes containing *Chlamydia pneumoniae*-specific IgG antibodies. *Eur Heart J* 2000;21:639-46.
  10. Boyle JJ. Association of coronary plaque rupture and atherosclerotic inflammation. *J Pathol* 1997;181:93-9.
  11. Libby P, Geng YJ, Aikawa M, Schoenbeck U, Mach F, Clinton SK, et al. Macrophages and atherosclerotic plaque stability. *Curr Opin Lipidol* 1996;7:330-5.
  12. Higuchi ML, Bezerra HG, Palomino S, Aiello VD, Libby P, Ramires JAF. Adventitial fibrosis and inflammation surrounding atheroma: Implications for different arterial remodeling in stable and unstable plaques. *J Am Coll Cardiol* 2000;35(Suppl A):368.
  13. Shoenfeld Y, Sherer Y, Harats D. Atherosclerosis. An infectious, inflammatory and autoimmune disease. *Trends in Immunology*: Disponible en: <http://news.bnn.com/hmsbeagle/102/notes/feature12>.
  14. Glagov S, Weisenberg E, Zarins CK, Stankunavicius R, Kolettis GJ. Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med* 1987;316:1371-5.
  15. Clarkson TB, Prichard RW, Morgan TM, Petrick GS, Klein KP. Remodeling of coronary arteries in human atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med* 1987;316:1371-5.
  16. Nishioka T, Luo H, Eigler NL, Berglund H, Kim CJ, Siegel RJ. Contribution of inadequate compensatory enlargement to development of human coronary artery stenosis. an in vivo intravascular ultrasound study. *J Am Coll Cardiol* 1996;27:1571-6.
  17. Smits PC, Bos L, Quarles Van Ufford MA, Eefting FD, Pasterkamp G, Borst C. Shrinkage of human coronary arteries is an important determinant of de novo atherosclerotic luminal stenosis. an in vivo intravascular ultrasound study. *Heart* 1998;79:143-7.
  18. Smits PC, Pasterkamp G, Jaegers PPT, Feyter PJ, Borst C. Angioscopic complex lesions are predominantly compensatory enlarged: an angioscopy and intracoronary ultrasound Study. *Cardiovasc Res* 1999;41:1458-64.
  19. Higuchi ML, Bezerra HG, Palomino S, Aiello VD, Libby P, Ramires JAF. Adventitial fibrosis and inflammation surrounding atheroma: implications for different arterial remodeling in stable and unstable plaques. *J Am Coll Cardiol* 2000;35(Suppl A):368.
  20. Higuchi ML, Gutiérrez PS, Bezerra HG, Palomino SA, Aiello VD, Silvestre JMC, et al. Comparison between adventitial and intimal inflammation of ruptured and non-ruptured atherosclerotic plaques in human coronary arteries [en prensa]. *Arq Bras Cardiol*.
  21. Gupta S. Chronic infection in the aetiology of atherosclerosis - focus on *Chlamydia pneumoniae*. *Atherosclerosis* 1999;143:1-6.
  22. Leinonen M, Saikku P. Interaction of *Chlamydia pneumoniae* infection with other risk factors of atherosclerosis. *Am Heart J* 1999;138:S504-6.
  23. Hoffmeister A, Rothenbacher D, Wanner P, Bode G, Persson K, Brellner H, et al. Seropositivity to chlamydial lipopolysaccharide and *Chlamydia pneumoniae*, systemic inflammation and stable coronary artery disease: negative results of a case-control study. *J Am Coll Cardiol* 2000;35:112-8.
  24. Wong Y, Thomas M, Tsang V, Gallagler PJ, Ward ME. The prevalence of *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerotic and nonatherosclerotic blood vessels of patients attending for redo a1ld first time coronary artery bypass graft surgery. *J Am Coll Cardiol* 1999;33:152-6.
  25. Ericson K, Saldeen TG, Lindquist O, Pahlson C, Mehta JL. Relationship of *Chlamydia pneumoniae* infection to severity of human coronary atherosclerosis. *Circulation* 2000;101:2568-71.
  26. Kuo C, Campbell LA. Detection of *Chlamydia pneumoniae* in arterial tissues. *J Infect Dis* 2000;181(Suppl 3):432-6.
  27. Higuchi ML, Castelli J, Aiello VD, Palomino S, Reis MM, Sambiasi NV, et al. Great amount of *C. pneumoniae* in ruptured plaque vessel segments at autopsy. A comparative study with stable plaques. *Arq Bras Cardiol* 2000;74:149-51.
  28. Higuchi ML, Sambiasi N, Palomino S, Gutiérrez P, Demarchi LM, Aiello VD, et al. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* in ruptured atherosclerotic plaques. *Braz J Med Biol Res* 2000;33:1023-6.
  29. Razin S, Yogev D, Naot Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol Molec Biol Ver* 1998;62:1094-156.
  30. Horne BD, Muhlestein JB, Carlsquist JF, Ohana B, Lipson M, Kahn N, et al. IgA seropositivity to *Mycoplasma pneumoniae* predicts the diagnosis of coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2000;35:A321.
  31. Tong CYW, Donnelly C, Harvey G, Sillis M. Multiplex polymerase chain reaction for the simultaneous detection of *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae* and *Chlamydia psittaci* in respiratory samples. *J Clin Pathol* 1999;52:257-63.
  32. Corsaro D, Valassina M, Venditti D, Venard V, Le Faou A, Valensin PE. Multiplex PCR for rapid and differential diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* in respiratory infections. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999;35:105-8.
  33. Opitz O, Pietsch K, Ehlers S, Jacobs E. Cytokine gene expression in immune mice reinfected with *Mycoplasma pneumoniae*: the role of T cell subsets in aggravating the inflammatory response. *Immunobiol* 1996-97;196:575-87.
  34. Kockx MM, Knaepen MW. The role of apoptosis in vascular disease. *J Pathol* 2000;190:2680.
  35. Almagor M, Kahane I, Yatziv S. Role of superoxide anion in host cell injury induced by *M. pneumoniae* infection. A study in normal and trisomy 21 cells. *J Clin Invest* 1984;73:842-7.
  36. Gallily R, Avron A, Jahnls-Streubel G, Muhlradt PF. Activation of macrophages and monocytes by mycoplasmas. En: Razin S, Tully JG, editors. *Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology*. Vol 1. Molecular characterization. San Diego: Academic Press, Inc., 1995; p. 421-38.
  37. Ross R. Atherosclerosis -an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115-26.
  38. Meijer A, Van Der Vliet JAQ, Roholl PJ, Gielis-Proper SK, De Vries A, Ossewaarde JM. *Chlamydia pneumoniae* in abdominal aortic aneurysms: abundance of membrane components in the absence of heat shock protein 60 and DNA. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:2680-6.
  39. Mallat Z, Hugel B, Ohan J, Leseche G, Freyssinet JM, Tedgui A. Shed membrane microparticles with procoagulant potential in human atherosclerotic plaques: a role for apoptosis in plaque thrombogenicity. *Circulation* 1999;99:348-53.
  40. Stacey A, Bradlow A. Arcanobacterium haemolyticum and *Mycoplasma pneumoniae*. Co-infection. *J Infection* 1999;38:41-53.
  41. Krause DC, Taylor-Robinson D. Mycoplasmas which infect humans. En: Maniloff RM, McElhaney RN, Finch LR, Baseman JB, editors. *Mycoplasmas. Molecular biology and pathogenesis*. Washington, DC: American Society of Microbiology, 1999; p. 417-44.
  42. Baseman JB, Tully JG. Mycoplasmas: sophisticated reemerging and burdened by their notoriety. *Emerging Inf Dis* 1997;3:21-32.
  43. Chambaud I, Wroblewski H, Blanchard A. Interactions between mycoplasma lipoproteins and the host immune system. *Trends Microbiol* 1999;7:493-9.