

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE INFECCIÓN POR *VIRUS HERPES SIMPLEX TIPO 1* EN TEJIDO ATEROSCLERÓTICO HUMANO.

MOLECULAR DIAGNOSIS OF INFECTION BY HERPES SIMPLEX TYPE 1 VIRUS IN HUMAN ATEROSCLERÓTICO TISSUE.

Franklin E. Torres J.¹, José Luis Villarreal C.², Axel A. Tolstano³, Edward Lozano H.⁴, Álvaro Peinado V.⁵, Nelys P. Movilla P.⁶, Lina M. Barroso M⁶.

Resumen:

Introducción: Las enfermedades del sistema circulatorio representan uno de los mayores problemas de salud pública a nivel mundial, nacional y regional. El mecanismo patogénico que subyace esta patología es la aterosclerosis. Existen varios factores que favorecen la etiopatogenia de la lesión aterosclerótica. Las infecciones, juegan un papel importante. La infección por el *Virus del Herpes Simplex* se ha considerado como un factor de riesgo emergente. **Objetivo:** Realizar diagnóstico molecular de infección por *Virus Herpes Simplex tipo 1* y *tipo 2* en tejido aterosclerótico humano. **Método:** Se realizó extracción de ADN viral a partir de ateromas usando el kit comercial PureGenome™ Tissue DNA Extraction. La amplificación del material genético viral se realizó por PCR en tiempo real (qPCR) con el kit comercial “*Human Herpes Virus 2 (Herpes simplex type 2) UL36 region genesig Standard Kit* y *Human Herpes Virus 1 (Herpes simplex type 1) Capsid assembly and DNA maturation gene. Genesig Standard Kit*”. **Resultados:** En total

1. MD, BSc, MSc. Investigador principal. Docente Investigador - Programa de Medicina - Universidad Libre de Barranquilla. franklintj654@hotmail.com
2. PhD(c), Docente Investigador - Programa de Medicina - Universidad Libre de Barranquilla.
3. MD, Cirugía Cardiovascular y Angiología. IPS Organización Clínica General del Norte (OCGN), Barranquilla – Colombia.
4. MD, Cirugía Cardiovascular. Jefe de Unidad del Corazón. IPS Organización Clínica General del Norte, Barranquilla – Colombia.
5. MD, Laboratorio de patología. Docente - Programa de Medicina - Universidad Libre de Barranquilla.
6. Semillero de investigación. Programa de Medicina - Unilibre Barranquilla.

se obtuvieron 102 muestras de ateromas, extraídas de diferentes fuentes anatómicas. Tres muestras resultaron positivas para VHS tipo 1 (3/102). Ninguna muestra evidenció material genético para VHS tipo 2 (0/102). **Conclusión:** La etiopatogenia de la aterosclerosis es un proceso altamente complejo. Los virus juegan un papel importante, en especial la infección por *Virus del herpes simplex tipo 1*. La infección por este virus genera cambios a nivel de las células vasculares y no vasculares, favoreciendo el acumulo de lipoproteínas de baja densidad químicamente oxidadas, importantes para la aterogénesis.

Palabras claves: Enfermedades circulatorias, aterosclerosis, inflamación, infección, *Virus Herpes simplex*.

Summary:

Introduction: Diseases of the circulatory system represent one of the greatest public health problems worldwide, nationally and regionally. The pathogenic mechanism that underlies this pathology is atherosclerosis. There are several factors that favor the etiopathogeny of the atherosclerotic lesion. Infections play an important role. Infection with Herpes Simplex Virus has been considered as an emerging risk factor. **Objective:** To perform molecular diagnosis of infection by Herpes Simplex virus type 1 and type 2 in human atherosclerotic tissue. **Method:** Viral DNA extraction was performed from atheromas using the commercial PureGenome™ Tissue DNA Extraction kit. The amplification of the viral genetic material was performed by real-time PCR (qPCR) with the commercial kit "Human Herpes Virus 2 (Herpes simplex type 2) UL36 region genesig Standard Kit and Human Herpes Virus 1 (Herpes simplex type 1) Capsid assembly and DNA maturation gene Genesig Standard Kit ". **Results:** A total of 102 samples of atheromas were obtained, extracted from different anatomical sources. Three samples were positive for HSV type 1 (3/102). No sample showed genetic material for HSV type 2 (0/102). **Conclusion:** The etiopathogenesis of atherosclerosis is a highly complex process. Viruses play an important role, especially the infection by *Herpes simplex virus type 1*. The infection by this virus generates changes at the

level of vascular and non-vascular cells, favoring the accumulation of chemically oxidized low density lipoproteins, important for the atherogenesis

Key words: Circulatory diseases, atherosclerosis, inflammation, infection, *Herpes simplex virus*.

Introducción

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) corresponden a un conjunto de patologías relacionadas con el corazón y los vasos sanguíneos. Actualmente, representan uno de los mayores problemas de salud pública a nivel mundial (1,2). La organización Mundial de salud (OMS), considera a la ECV como la principal causa de muerte en todo el mundo, argumentando que cada año mueren más personas por ECV que por cualquier otra causa (3). Se calcula que en 2012 aproximadamente murieron 17,5 millones de personas por esta causa, lo cual representa un 31% de todas las muertes registradas en el mundo. De estas muertes, 7.4 millones se debieron a la cardiopatía coronaria y 6.7 millones a los accidentes vasculares cerebrales (AVC) (3).

El Ministerio de la Protección Social, en noviembre del 2016, en el informe sobre la Situación de salud en Colombia (ASIS); reportó que entre el periodo del 2005 al 2014, la principal causa de mortalidad en hombres y en mujeres fueron las enfermedades del sistema circulatorio (4). Donde las enfermedades isquémicas del corazón produjeron el 49.30% (293.458) de las muertes por enfermedades del sistema circulatorio, pasando de 78.89 a 7824 muertes por cada 100.000 habitantes. La segunda causa más frecuente de mortalidad por enfermedad del sistema circulatorio fueron las enfermedades cerebrovasculares, causando el 20.93% (64.196) de las defunciones de hombres y el 10.78% del total de muertes en el grupo de causas (4).

En el departamento del Atlántico, especialmente el distrito de Barranquilla, las enfermedades isquémicas del corazón representan la principal causa de muerte a nivel general de la población, aproximadamente 1.116 defunciones reportadas en el

año 2009; con una tasa de mortalidad de 59.6 por cada 100 mil habitantes (5). Le siguen las enfermedades cerebrovasculares, con un total de 645 defunciones y una tasa de mortalidad de 34.4 por cada 100 mil habitantes; y las agresiones (Homicidios) con 463 muertes y una tasa de mortalidad de 24.7/100 mil hab, respectivamente (6).

El análisis de la situación de salud del distrito de Barranquilla año 2016, en lo concerniente al análisis de mortalidad general por grandes causas, determinó que las causas que tienen mayor peso son las enfermedades del sistema circulatorio, con una tasa que llegó a ser de 183.8 en el 2005 y 181.17 en el año 20149 (7).

El principal mecanismo patogénico que subyace la génesis y desarrollo de enfermedades del sistema circulatorio es la aterosclerosis (8), la cual es considerada como un proceso patológico complejo y progresivo de la pared arterial que afecta especialmente a las arterias coronarias, cerebrales y periféricas (9). Las lesiones vasculares ateroscleróticas son el resultado de complejas interacciones entre células inflamatorias, plaquetas, elementos vasculares y lipoproteínas que regulan la expresión de genes y proteínas directamente involucradas en el proceso de remodelado vascular (10); lo cual conlleva a la estenosis y/o oclusión de la luz del vaso afectado generando hipoxia y necrosis isquémica en órganos vitales como corazón y cerebro.

Actualmente se han asociado varios factores que favorecen al desarrollo de la lesión aterosclerótica, algunos genéticos otros ambientales, algunos modificables otros no modificables; algunos son considerados como clásicos o tradicionales y otros como emergentes, que en la actualidad son terreno activo de investigación a nivel mundial (11). Dentro de los factores de riesgos emergentes, las infecciones, juegan un papel importante tanto en el inicio como en el desarrollo de la ateromatosis (12), tanto las bacterias como los virus juegan un papel clave en la disfunción endotelial que conlleva a la oxidación de lipoproteínas de baja densidad y la subsecuente cascada molecular y celular que favorece la consolidación e inestabilidad del ateroma (13).

La infección por *Herpes Virus* (VHS) es muy frecuente en la población general, considerándose como un virus ubicuo de fácil transmisión y alta infectividad (14). Muchos estudios respaldan la asociación que existe entre la infección por VHS y el riesgo de enfermedad vascular aterosclerótica (15). Sin embargo, los resultados no han sido reproducibles en su totalidad, por lo que aún no hay consenso en la comunidad científica que respalda la hipótesis infecciosa de la aterosclerosis.

Teniendo en cuenta el gran impacto de las enfermedades circulatorias, cardiovasculares y cerebrovasculares, en la población de Barranquilla; decidimos realizar el diagnóstico molecular de la infección por VHS a partir de tejido aterosclerótico humano, en una cohorte de pacientes que acuden a los servicios de cirugía cardiovascular y angiología en dos instituciones prestadoras de salud (IPS) en la ciudad de Barranquilla – Colombia.

Métodos:

- Selección de pacientes:

Se realizó un estudio descriptivo de corte transversal, en una muestra de 102 individuos, mayores de 35 años, de ambos sexos, que acuden a los servicios de cirugía cardiovascular y angiología en la IPS Organización Clínica General del Norte (OCGN) y Clínica de la Costa de Barranquilla. Todos los participantes respondieron al consentimiento informado y a una entrevista estructurada para evaluar condiciones antropométricas, clínicas y de historia familiar. Fueron excluidos del estudio individuos con edad inferior a 35 años, gestantes, obesos mórbidos ($IMC \geq 40 \text{ kg/m}^2$) y todos aquellos que estén en tratamiento para enfermedades de la tiroides, reumáticas, hepáticas y neoplásicas.

- Obtención y preparación del tejido aterosclerótico:

Las muestras fueron tomadas por profesionales expertos en cirugía cardiovascular y angiología, por medio de técnicas de endarterectomía y/o disección del vaso afectado según la patología subyacente en cada paciente. Los especímenes fueron embebidos en solución de formaldehído al 4%, y transportados al laboratorio de Biología molecular de la Universidad Libre para su posterior análisis. Se realizó

extracción de ADN viral a partir de los ateromas obtenidos usando el kit comercial PureGenome™ Tissue DNA Extraction, siguiendo las especificaciones del fabricante. Posteriormente se realizó amplificación de material genético viral usando la técnica de PCR en tiempo real (qPCR) con el kit comercial “Human Herpes Virus 2 (*Herpes simplex type 2*) UL36 region genesig Standard Kit y Human Herpes Virus 1 (*Herpes simplex type 1*) Capsid assembly and DNA maturation gene. Genesig Standard Kit”.

Resultados:

De las 102 muestras analizadas, ninguna resultó positiva para el VHS tipo 2. Sin embargo, 3 muestras dieron positivas para VHS tipo 1. Las muestras que resultaron positivas fueron: 10, 66 y 245 (Ver figura 1).

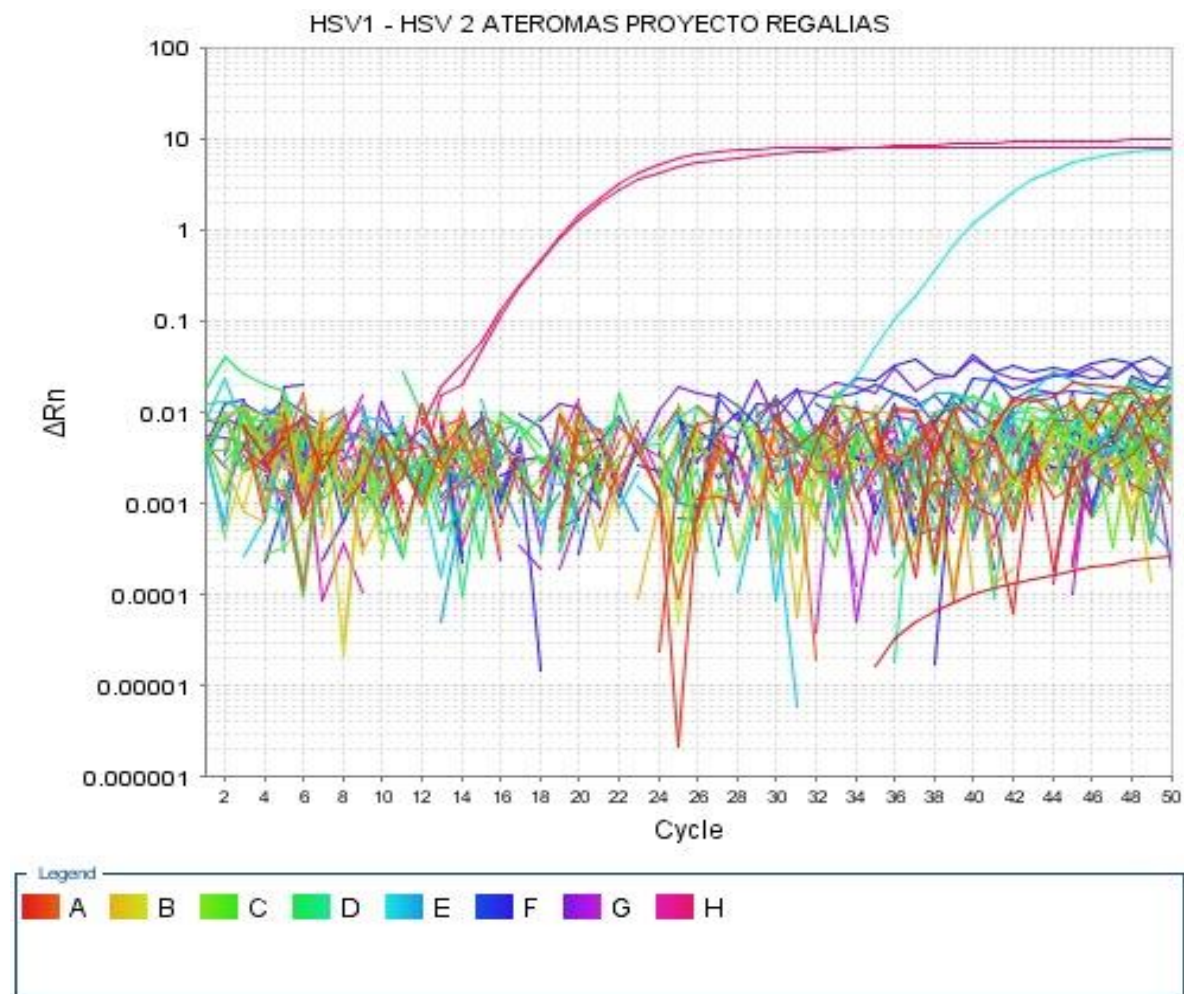


Figura 1. Resultado de qPCR VHS tipo 1 a partir de tejido aterosclerótico.

La muestra # 10 corresponde a masculino de 57 años, con diagnóstico de dilatación severa de la raíz aórtica e hipertrofia del ventrículo izquierdo. Hipertenso, con índice de masa corporal normal, sin diabetes, no alcohol, no tabaco. El tejido aterosclerótico fue obtenido a partir de válvula aórtica.

La muestra # 66 corresponde a masculino de 62 años, con enfermedad coronaria aterosclerótica severa de 3 vasos. Buen índice de masa corporal, hipertenso y diabético, no alcohol, no tabaco. Tejido aterosclerótico obtenido a partir de arteria coronaria descendente posterior.

Muestra # 245 corresponde a masculino de 62 años, con arteriopatía carotídea derecha. Paciente con sobrepeso, hipertensión y tabaquista. No alcohol, no diabetes. Tejido aterosclerótico obtenido a partir de arteria carótida derecha.

Discusión:

Fisiopatológicamente, la aterosclerosis se inicia con la disfunción del endotelio vascular inducida por la alteración bioquímica de las lipoproteínas de baja densidad (LDL). Específicamente por la oxidación de las LDL mediada por diversos factores desencadenantes como: Incremento de las fuerzas de estrés sobre la pared vascular, hipertensión arterial, diabetes mellitus, sobrepeso, tabaquismo, infecciones, entre otros factores que generan una respuesta inflamatoria endotelial (16). Este proceso genera la lesión básica que es la placa de ateroma compuesta fundamentalmente de lípidos, tejido fibroso y células inflamatorias (17). A medida que el proceso inflamatorio persiste, se evidencian cambios histopatológicos en la placa que favorecen la inestabilidad de ésta, trayendo como consecuencia la rotura, hemorragia y formación de trombos, lo que se conoce como “Evento aterotrombótico” (18,19); íntimamente relacionado con los diversos fenotipos clínicos de ECV como lo es el infarto agudo al miocardio tipo 1 (IAM tipo I) y accidentes cerebro vasculares de tipo isquémico (20,21).

Las infecciones virales, son uno de los principales factores ambientales que favorecen la aterogénesis (22). El mecanismo patogénico mediado por los virus puede ser dual o una sinergia entre ellos. La literatura científica especializada en el

tema considera un mecanismo “Directo” sobre las células endoteliales y otro mecanismo “Indirecto” sobre otras células NO endoteliales, que favorecen una respuesta inflamatoria sistémica conllevando a la oxidación de las LDL sobre la íntima vascular.

Directamente se ha identificado que los virus que infectan las células endoteliales favorecen la expresión de moléculas antigénicas sobre la superficie endotelial, lo cual promueve una respuesta inflamatoria localizada con la participación del componente celular y molecular del sistema inmunológico innato y adquirido (23). La respuesta inmune crónica y persistente facilita el desarrollo de una lesión aterosclerótica que dependiendo de múltiples factores puede avanzar hasta la oclusión de la luz vascular o en su defecto a la inestabilidad de la placa conllevando a un evento aterotrombótico.

El primer agente infeccioso identificado de manera directa con la aterosclerosis fue un tipo apícola de herpesvirus (asociado a la enfermedad de Mareck), el cual fue inoculado en gallinas libres de todo tipo de infección y alimentadas con una dieta rica en colesterol por Fabricant y cols, en 1978 (24). Luego del sacrificio de estos animales se apreciaron lesiones ateroscleróticas claramente visibles y de avanzado tipo, similares a las humanas. El mismo grupo inmunizó con posterioridad a este tipo de animales con el fin de prevenir el desarrollo de aterosclerosis tras la inoculación, con resultados alentadores, documentando una particular acumulación de ésteres de colesterol en las células musculares lisas (25).

A principios de la década de 1990, Etingin y cols, demostraron que la molécula de adhesión GMP140 puede ser expresada por las células endoteliales infectadas por VHS, y podría mediar la lesión celular e inflamación a nivel endotelial (26). Chirathaworn y cols, demostraron que la infección por VHS 1 en células endoteliales incrementa la expresión de la molécula LOX-1, la cual exacerba el proceso de captación de LDL oxidadas en células endoteliales infectadas por este virus (27). Estos resultados fueron reproducibles por Hajjar y cols, quienes evidenciaron que las células del músculo liso vascular (VSMC) infectadas por VHS acumulaban más ésteres de colesterol saturados y triacilgliceroles, que en células no infectadas (28).

Indirectamente se ha evidenciado el fenómeno de “mimetismo molecular” entre moléculas virales y algunas proteínas que conforman la maquinaria molecular de la célula endotelial y muscular vascular (29). Se ha evidenciado que las células infectadas por VHS presentan alteración metabólica del colesterol favoreciendo el acumulo de estas moléculas sobre la íntima vascular. También se ha evidenciado que la infección por VHS favorece a un ambiente procoagulante y antifibrinolítico, vital para el efecto aterotrombótico científicamente demostrado (30).

Conclusiones:

Las enfermedades del sistema circulatorio representan un problema prioritario de salud pública a nivel mundial, nacional y regional. La aterosclerosis es el principal mecanismo patogénico responsable de los diversos fenotipos clínicos tanto de enfermedad cardiovascular como de accidentes cerebro vasculares. Con respecto a la etiopatogenia de la lesión aterosclerótica, aún hay más preguntas que respuestas. Lo anterior se debe, principalmente, a la presentación multifactorial de la enfermedad, algunos genéticos y otros ambientales, como también a la sinergia que resulte entre ellos. Por lo tanto, hace de esta temática un terreno activo de investigación científica constante y persistente, a nivel de ciencias básicas médicas como también en la práctica clínica actual.

Con respecto al papel de la infección por VHS en la etiopatogenia de la aterosclerosis, existe evidencia científica que involucra la participación del virus con la aterogénesis, sin embargo, los resultados no son reproducibles entre una población y otra. Por lo tanto, varios estudios tanto básicos como clínicos son necesario para poder definir el papel de la infección por VHS en la aterosclerosis humana.

Agradecimientos:

El presente artículo de investigación es un producto del proyecto de investigación titulado “Identificación de la Carga Infecciosa, Cuantificación de citoquinas proinflamatorias y Caracterización de lesiones ateroscleróticas; en pacientes que acuden al servicio de cirugía cardiovascular pertenecientes a la red hospitalaria del Departamento del Atlántico durante los años 2016 – 2017”. Financiado por el Sistema General de Regalías del Departamento del Atlántico a través del programa de CT+I EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS EN TODO EL DEPARTAMENTO DEL ATLÁNTICO – BPIN 2014000100039. OBJETIVO 2 – ACTIVIDAD 06 DEL PROGRAMA. CONVENIO NÚMERO 0103*2015*000031.

Bibliografía:

1. Murray CJ, Barber RM, Foreman KJ, et al. Global, regional, and national disability-adjusted life years (DALYs) for 306 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE) for 188 countries, 1990-2013: quantifying the epidemiological transition. *Lancet* 2015; 386: 2145-91.
2. Murray CJ, Vos T, Lozano R, et al. Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010.
3. *Lancet* 2012; 380: 2197-223. Who.int [Internet]. Suiza: who; 2015 [actualizado Feb 2015; citado 1 nov 2017]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/es>
4. Minsalud.gov.co [Internet]. Colombia: Minsalud, 2016 [actualizado Ene 2015; citado 1 nov 2017] Disponible en: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/ED/PS/P/asis-colombia-2016.pdf>
5. Lista 6/667 CIE 10 de OPS. Estadísticas Vitales DANE 2009. https://www.dane.gov.co/files/investigaciones/.../Lista667_OPS.xls
6. Indicadores Básicos Situación de Salud en Colombia 2011. Ministerio de salud y protección social. <https://www.minsalud.gov.co/salud/.../indicadoresbasicosp.aspx>

7. Análisis de situación de salud del distrito de barranquilla año 2016. www.barranquilla.gov.co/salud/index.php/informes/doc_download/198-
8. Libby P, Bornfeldt KE, Tall AR. Atherosclerosis: successes, surprises, and future challenges. *Circ Res* 2016; 118:531-4.
9. Tarkin JM, Dweck MR, Evans NR, Takx RAP, Brown AJ, Tawakol A, Fayad ZA, Rudd JHF. Imaging atherosclerosis. *Circ Res.* 2016;118:750 –769. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306247.
10. Gimbrone MA Jr, Garcia-Cardena G. Endothelial cell dysfunction and the pathobiology of atherosclerosis. *Circ Res.* 2016;118:620–636. doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.306301.
11. Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, Anderson JL, Cannon RO 3rd, Criqui M, Fadl YY, Fortmann SP, Hong Y, Myers GL, Rifai N, Smith SC Jr, Taubert K, Tracy RP, Vinicor F, Centers for Disease C, Prevention, American Heart A (2003) Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: a statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation* 107(3):499–511. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000052939.59093.45>
12. Campbell LA, Rosenfeld ME (2015) Infection and atherosclerosis development. *Arch Med Res* 46(5):339–350. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2015.05.006>
13. Estein S, Zhou Y, Zhu J. Infection and atherosclerosis: emerging mechanism paradigms. *Circulation* 1999;100:e20–e28.
14. Malkin JE (2004) Epidemiology of genital herpes simplex virus infection in developed countries. *Herpes* 11(Suppl 1):2A–23A.
15. Hechter RC, Budoff M, Hodis HN, Rinaldo CR, Jenkins FJ, Jacobson LP, Kingsley LA, Taiwo B, Post WS, Margolick JB. Herpes simplex virus type 2 (HSV-2) as a coronary atherosclerosis risk factor in HIV-infected men: multicenter AIDS cohort study. *Atherosclerosis* 2012; 223(2):433–436. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2012.03.002>

16. R. Ross, Atherosclerosis an inflammatory disease, *N. Engl. J. Med.* 340 (1999)115-126.
17. P. Libby, G. Pasterkamp, Requiem for the 'vulnerable plaque', *Eur. Heart J.* 36(43) (2015 Nov 14) 2984-2987, <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehv349>.
18. Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, et al. Heart disease and stroke statistics — 2016 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 2016;133(4): e38-e360.
19. E. Falk, M. Nakano, J.F. Bentzon, et al., Update on acute coronary syndromes: the pathologists' view, *Eur. Heart J.* 34 (2013) 719-728.
20. Anderson, J. L., and Morrow, D.A., Acute Myocardial Infarction. *N Engl J Med.* 2017;376:2053-64. DOI: 10.1056/NEJMra1606915.
21. Langhorne P, Fearon P, Ronning OM, Kaste M, Palomaki H, Vemmos K, et al. Stroke unit care benefits patients with intracerebral hemorrhage: systematic review and meta-analysis. *Stroke.* 2013;44(11):3044-9.
22. Rosenfeld ME, Campbell LA. Pathogens and atherosclerosis: update on the potential contribution of multiple infectious organisms to the pathogenesis of atherosclerosis. *Thromb Haemost* 2011;106(5):858–867. <https://doi.org/10.1160/TH11-06-0392>
23. O'Connor S, Taylor C, Campbell LA, Epstein S, Libby P. Potential infectious etiologies of atherosclerosis: a multifactorial perspective. *Emerg Infect Dis* 2001; 7(5):780–788. <https://doi.org/10.3201/eid0705.010503>
24. Fabricant CG, Fabricant J, Litrenta MM, Minick CR. Virus-induced atherosclerosis. *J Exp Med* 1978; 148: 335-340.
25. Fabricant CG, Hajjar DP, Minnick CR, Fabricant J. Herpesvirus infection enhances cholesterol and cholesteryl ester accumulation in cultured arterial smooth muscle cells. *Am J Path* 1981; 105: 176-184.
26. Etingin OR, Silverstein RL, Hajjar DP. Identification of a monocyte receptor on herpesvirus-infected endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88(16):7200–7203. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.16.7200>

27. Chirathaworn C, Pongpanich A, Poovorawan Y. Herpes simplex virus 1 induced LOX-1 expression in an endothelial cell line, ECV 304. *Viral Immunol* 2004;17(2):308–314. <https://doi.org/10.1089/0882824041310531>
28. Hajjar DP, Pomerantz KB, Falcone DJ, Weksler BB, Grant AJ. Herpes simplex virus infection in human arterial cells. Implications in arteriosclerosis. *J Clin Invest* 1987; 80(5):1317–1321. <https://doi.org/10.1172/JCI113208>
29. Hajjar D. Viral pathogenesis of atherosclerosis: impact of molecular mimicry and viral genes. *Am. J. Pathol.* 1991; 139:1195–1211.
30. Rulin C. Hechter, Matthew Budoff; *Atherosclerosis* 223 (2012) 433e436; 2012 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved. 3 March 2012.