

## DETECCIÓN DE *HELICOBACTER PYLORI* EN PLACAS DE ATEROMA

### ELICOBACTER PYLORI DETECTED IN ATHEROMA PLAQUE

Ghirardi G, Maldonado F, Guzmán L, Juaneda J, Zúñiga ME.

Servicio de Anatomía Patológica y Departamento de Cardiología. Hospital Córdoba.  
Córdoba. Argentina.

#### RESUMEN

**Introducción:** la infección y la inflamación crónica han sido implicadas como agentes etiológicos para la aterosclerosis (ATE). Varios estudios han relacionado a la infección por *H. Pylori* (HP) con la EC, especialmente con los linajes más virulentos (linaje Cag A). **Objetivo:** demostrar la presencia del HP en placas de endarterectomías, utilizando una técnica Inmunohistoquímica (IHQ) específica que revela una reacción Ag-Ac mediante un cromógeno. **Material y Métodos:** se estudiaron 34 placas ATE de distintos territorios vasculares. Se fijaron en formol, descalcificándolas en ácido fórmico según necesidad. Fueron incluidos en parafina, cortados y coloreados con H-E y técnicas de IHQ específicas para HP. Luego fueron desparafinados y tratados térmicamente con una solución de recuperación antigénica (Inmuno DNA Retriever with Citrate) utilizando olla a presión. La IHQ se efectuó con un sistema de alta sensibilidad Biotina-Estreptavidina-Peroxidasa-DAB). La observación morfológica evaluó células inflamatorias mononucleares y la identificación de la bacteria en la pared o la luz vascular. **Resultados:** de los 34 casos estudiados, en 14 se pudo identificar el bacilo en sus diferentes formas (41,17%), asociado a signos de inflamación crónica. **Conclusión:** el HP estuvo presente en un número sustancial de lesiones ATE y se asoció con

inflamación. Estudios recientes sugieren que la presencia de HP, demostrada por técnicas de IHQ, potenciaría los FR para ATE, induciendo una respuesta celular inflamatoria crónica por irritación persistente de la pared arterial.

**Palabras clave:** *Helicobacter pylori*, aterosclerosis, placa de ateroma, autoinmunidad.

#### ABSTRACT

**Introduction:** In general, infection and chronic inflammation have been implied as etiologic agents for atherosclerosis and in particular coronary illness (CI). Several studies have correlated the infection of *Helicobacter pylori* with CI, especially with virulent strains (lineage Cag A).

**Objective:** Demonstrate the immunohistochemical presence of *H. Pylori* in atherosclerotic plaques obtained from endarterectomy of different vascular regions.

**Material and methods:** 34 atherosclerotic plaques of different vascular areas were studied, (25 men and 9 women). The tissues were fixed with 10% neutral buffered-formalin and decalcifying in formic acid 5% was used when necessary. The tissue sections were included in paraffin, cut and colored with H&E and subjected to Immunohistochemistry (IHC) of *H. Pylori*. Briefly, tissues were deparaffinized and

thermally treated with a citrate-based solution of antigenic retrieval (ImmunoDNA Retriever with Citrate, BIO SB, Santa Barbara, CA) using a water bath at 95°C for 1 hour. The IHC was conducted using a high sensitivity Biotin-Streptavidin-HRP-DAB IHC system (ImmunoDetector HRP/DAB, BIO SB). The microscopic observation evaluated the presence of mononuclear inflammatory cells and the identification of the bacteria in the wall or the vascular lumen.

Results: Of the 34 cases studied 14 were positive, where one could identify the bacillus in their different forms (41,17%) associated with chronic inflammation.

**Key words:** *Helicobacter pylori*, atherosclerosis, atheroma plaque, autoimmunity.

## INTRODUCCIÓN:

La aterosclerosis es un proceso multifactorial donde esta involucrado el tabaco, la hipertensión, la hipercolesterolemia y la diabetes. La infección y la inflamación crónica están recientemente implicadas como agentes etiológicos importantes para aterosclerosis en general y enfermedad cardíaca isquémica en particular (1). La lesión crónica y repetida del endotelio es la piedra angular de la hipótesis de la respuesta a una lesión. Serios estudios han sugerido como responsables de la inflamación crónica al citomegalovirus (2), *Chlamydia pneumoniae* (3-4) y *Helicobacter pylori* (5-6). La *Chlamydia pneumoniae* se encuentra frecuentemente en las lesiones ateroscleróticas avanzadas de las arterias carótidas de pacientes que sufren endarterectomías (7).

El *Helicobacter pylori* es un bacilo curvado GRAM-, microaerófilo, espiralado, fusado y flagelado que coloniza el sistema gastrointestinal de casi todos los adultos y esta asociado con gastritis crónica, enfermedad ulcero-péptica y cáncer gástrico. Produce una característica enzima que es una potente subunidad ureasa (8), que es crucial para su sobrevivida en pH ácido y para su satisfactoria colonización gástrica. Ciertos reportes han

implicado la infección por *Helicobacter pylori* en la enfermedad arterial coronaria, especialmente con los linajes más virulentos (linaje Cag A)(9). La virulencia individual de *Helicobacter pylori* puede ser medido por su habilidad para producir una citotoxina asociada a proteínas (Cag A) y una citotoxina activa vacuolizante (Vac A)(10). La Vac A induce la formación de vacuolas ácidas en células epiteliales huésped y dicha presencia está asociada epidemiológicamente con daño tisular y enfermedad (11). Fue propuesto que estas proteínas pueden ser retenidas en la superficie externa de la membrana celular y contribuir en la interacción entre *Helicobacter pylori* y células huésped.

Un estudio reciente sugiere que en individuos jóvenes japoneses, la infección por *Helicobacter pylori* está significativamente asociada con IAM independientemente de los factores de riesgo coronarios clásicos (12).

Como con otras enfermedades infecciosas la predisposición para un dado agente infeccioso que contribuya al desarrollo de aterosclerosis, dependería de la interacción patógeno-huésped (13).

La infección puede contribuir en el proceso de aterosclerosis promoviendo la injuria de la pared de los vasos iniciado por los lípidos oxidantes, oxidantes derivados del tabaco, la hipertensión y moléculas glicosiladas de la diabetes. La inflamación y la reacción inmune en respuesta a la infección estarían exacerbadas y actuaría sinérgicamente en partes iguales con todos los ya mencionados vasculotóxicos (14).

En el tubo digestivo, especialmente en estómago, la misma bacteria puede producir diferentes formas de gastritis: preneoplásicas y no preneoplásicas; en ambos casos predominan las infecciones con cepas virulentas Cag A positivas.

La bacteria no se incorpora al DNA celular y en cambio permanece en una posición extracelular, en las capas de mucina de la luz gástrica. Algunos autores proponen que causa una disfunción del sistema inmunológico: la respuesta inmunológica es incapaz de eliminar la bacteria, controlar la colonización. En cambio sí produce daño al huésped (15).

Otro mecanismo de carcinogénesis, propone que el daño oxidativo es la vía final común de la carcinogénesis.

Dicha hipótesis encuentra mucho soporte en el proceso inflamatorio inducido por el *Helicobacter pylori* en la mucosa gástrica. Los polimorfonucleares neutrófilos y los macrófagos que forman parte prominente del infiltrado inflamatorio pro-neoplásico, sintetizan abundante enzima sintetasa inducible de óxido nítrico. Los distintos óxidos nítricos que resultan son altamente mutagénicos, pero de corta duración. Los neutrófilos emigran de los capilares del estroma hacia la luz gástrica, en donde crecen las bacterias en las cuales los óxidos nítricos tendrían efectos letales.

Pero muchos leucocitos se degeneran, se desintegran, y vierten sus microexplosiones oxidativas (oxidative bursts) antes de alcanzar su presa. En esta agresividad vicariante, el blanco de la microexplosión oxidativa resulta ser la célula epitelial, generalmente en el proceso de síntesis activa del DNA como parte del proceso de replicación celular (16).

El *Helicobacter pylori* es la causa más frecuente de enfermedad úlcero-péptica y está presente como un factor de riesgo en la enfermedad cerebrovascular isquémica. Sin embargo, en contraste con otros agentes infecciosos crónicos, *Helicobacter Pylori* no ha podido ser aislado de las lesiones ateroscleróticas (17).

## OBJETIVOS

Es demostrar la presencia del *Helicobacter pylori* en la pared o la luz de las placas ateroscleróticas obtenidas de endarterectomías de distintas regiones vasculares, utilizando una técnica inmunohistoquímica específica que revela una reacción antígeno-anticuerpo a través de un sistema de detección y un cromógeno, que en nuestro caso es la diaminobencidina.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se estudiaron 34 casos obtenidos de endarterectomías de pacientes con lesiones

ateroescleróticas que producían estenosis de los vasos.

Fueron incluidos 14 especímenes obtenidos de endarterectomías carotídeas, 9 de endarterectomías coronarias, 6 aórticas, 3 femoral, 1 poplítea, 1 iliaca primitiva izquierda. De los especímenes extraídos de pacientes adultos, 24 correspondieron a hombres y 9 a mujeres con un promedio de edad de 58,2 años. Como control se utilizó biopsias de mucosa gástrica.

Los especímenes fueron fijados en formol buffer al 10% y posteriormente descalcificados en ácido fórmico al 5% en los casos necesarios. Todos fueron procesados de rutina, incluidos en parafina y posteriormente se realizaron cortes de 4  $\mu$  para estudios de rutina como Hematoxilina-Eosina y de 3  $\mu$  para estudios de inmunohistoquímica, los que se marcaron con antígeno específico para *Helicobacter pylori*.

Los cortes fueron desparafinados y tratados térmicamente con una solución de recuperación antigénica (Immuno DNA Retriever with Citrate) utilizando una olla a Presión durante 10 minutos. Para los estudios de Inmunohistoquímica se utilizó un sistema de alta sensibilidad Biotina-Estreptavidina-Peroxidasa-DAB (ImmunoDetector HRP/DAB, BIO SB).

**Análisis de las muestras:** la evaluación morfológica incluyó la investigación de células inflamatorias mononucleares y la identificación de la bacteria en sus diferentes formas en la luz o la pared vascular.

## RESULTADOS

De los 34 casos estudiados en 14 se pudo identificar la bacteria (41,17%), en sus diferentes formas. De los casos positivos el 84,6% correspondieron a hombres y el 15,4% a mujeres, con un promedio de edad de 63,1 años. Ejemplos, figuras 1 a 4.

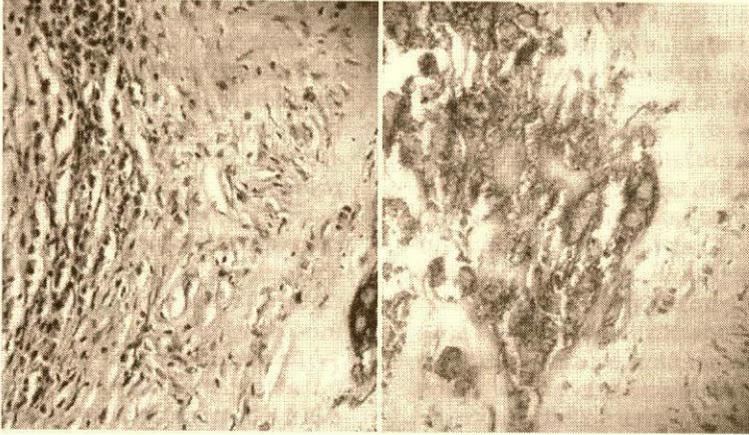


Figura 1: placa de ateroma con inflamación HE (40x).

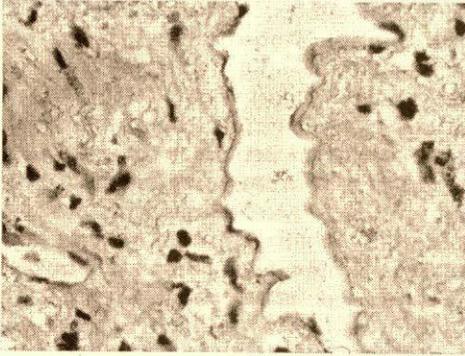


Figura 2: inmunohistoquímica en placa de ateroma, se visualiza en la luz y pared vascular numerosos bacilos (40x).

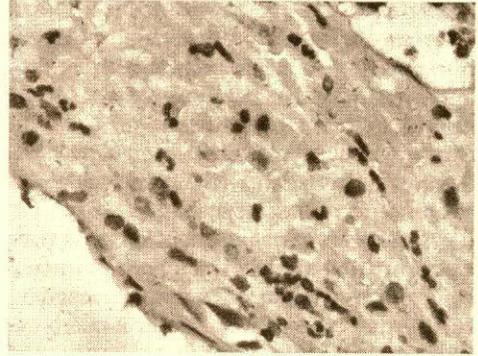


Figura 3: inmunohistoquímica en placa de ateroma, se visualiza en la pared vascular numerosos *Helicobacter pylori* (40x).

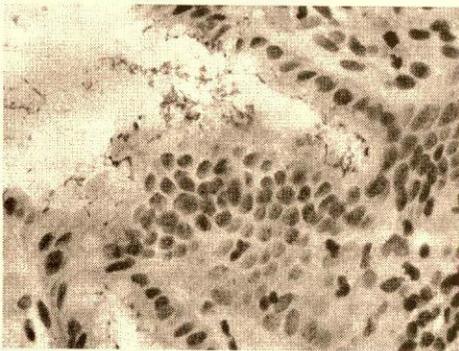


Figura 4: control gástrico, inmunohistoquímica en placa de ateroma, se visualiza en la luz y mucosa gástrica numerosos *Helicobacter pylori* (40x).

## DISCUSIÓN

La implicancia evidente de *Helicobacter pylori* en la enfermedad arterial aterosclerótica es controvertida.

El *Helicobacter pylori* está presente en un importante número de lesiones ateroscleróticas y especialmente asociado con características inflamatorias y el sexo masculino.

Estudios recientes sugieren que la presencia del bacilo, demostrada por técnicas de inmunohistoquímica, podría potenciar los factores de riesgo conocidos para aterosclerosis, induciendo una respuesta celular inflamatoria crónica por irritación persistente que producida por dicho agente en la pared arterial.

El presente trabajo pretende aportar un dato más a las investigaciones sobre el tema, teniendo en cuenta que en nuestro medio hospitalario se realizan cirugías cardiovascularmente de rutina.

Parece probable en la actualidad que los factores autoinmunes formen parte de los mecanismos responsables de la aterosclerosis y que la infección podría ser uno de los factores inductores de la autoinmunidad. Este efecto podría derivar, en parte, de la similitud molecular, un mecanismo que requiere que el patógeno infectante contenga péptidos similares a los que están presentes en las proteínas del huésped. La respuesta inmunitaria resultante, aunque estimulada por los antígenos de los patógenos y dirigida contra ellos, también afectaría a los tejidos del huésped que contienen los péptidos de reacción cruzada.

#### **Función de las proteínas de choque térmico**

La posible realidad de este concepto ha sido sugerida en estudios en los que se han identificado autoanticuerpos frente a proteínas de choque térmico (HSP) en pacientes con aterosclerosis. La expresión de estas proteínas intracelulares ubicuas, que normalmente están presentes en concentraciones bajas, aumenta en respuesta a la sobrecarga o tensión, lo que hace que partes de estas proteínas sean transportadas hasta la membrana celular en donde son accesibles al sistema inmunitario. Es destacable el hecho que en todas las bacterias que codifican HSP y que los virus, aunque en general no codifican HSP, incorporan las HSP del huésped en sus cubiertas cuando presentan gemación en las células del huésped. Por tanto, la respuesta inmunitaria dirigida contra las HSP de un patógeno podría, mediante mecanismos de reactividad cruzada, contribuir al desarrollo de la aterosclerosis (18).

#### **Papel del monocito en la génesis de la aterosclerosis**

La presencia de macrófagos es un hecho por lo general constante en las lesiones de la aterosclerosis. El papel fundamental del monocito en la lesión endotelial coronaria viene a justificar la

existencia de un mecanismo inflamatorio en la génesis de las placas de ateroma coronarias (19).

No se ha determinado con certeza qué estímulos atraen a los monocitos. No puede descartarse que ciertas infecciones puedan tener un papel primordial en la misma o, incluso, que los propios monocitos vehiculicen determinados microorganismos intracelulares hasta el lugar de la inflamación (20).

#### **El concepto de cantidad de patógenos en la aterosclerosis**

En un segundo estudio, de tipo prospectivo, se determinó el nivel de anticuerpos frente a CMV, VHA, VHS1 y VHS2, *Chlamydia pneumoniae* y *Helicobacter pylori* en más de 900 pacientes con cardiopatía isquémica establecida mediante angiografía. En el seguimiento se observó que a medida que aumentaba el número de patógenos que afectaban al paciente, también aumentaba el riesgo de infarto miocárdico o de fallecimiento. Los patógenos seleccionados en ambos estudios compartían dos características comunes: todos son patógenos intracelulares obligados y que dan lugar a una respuesta inmunitaria persistente de por vida (manifestada por el incremento en los niveles de anticuerpos) (21).

#### **CONCLUSIONES**

Se pudo detectar la presencia del bacilo (*Helicobacter pylori*) en un número considerable de lesiones ateroscleróticas (41,17%), empleando técnicas específicas de inmunohistoquímica. La presencia del *Helicobacter pylori* fue asociada con el sexo masculino, pero no con la edad de los pacientes. No se pudo demostrar relación entre lesiones ateroscleróticas e infección gástrica por *Helicobacter pylori*.

Es nuestro objetivo continuar estas investigaciones, ampliando el número de casos, y dirigirlas además hacia estudios moleculares que evalúen si fueron los linajes más virulentos de HP, los detectados en las lesiones ateroscleróticas de las paredes vasculares.

**BIBLIOGRAFÍA**

1. Maseri A. Inflammation, atherosclerosis and ischemic events: exploring the hidden side of the moon. *N Engl J Med* 1997;336:1014-1016.
2. Epstein SE, Speir E, Zhou YF, Guetta E, Leon M, Finkel T. The role of infection in restenosis and atherosclerosis: focus on CMV. *Lancet* 1996; 349(suppl 1):s13-s17.
3. Saikku P, Leinonen M, Tenkanen L, Linnanmaki E, Ekman MR, Manninen V, Mantari M, Frick MH, Ataño JK, Chronic *Clamidia pneumoniae* infection as a risk factor for coronary heart disease in the Helsinki heart study. *Ann Intern Med* 1992;116:273-278.
4. Kuo C-C, Shor A, Campbell LA, Fukushi H, Patton DL, Grayston JT. Demonstration of *Clamidia pneumoniae* in atherosclerosis lesions of the coronary arteries. *J Infect Dis* 1993;167:841-849.
5. Mendall MA, Goggia PM, Molineaux N, Levy J, Toosy T, Strachnan D, Lamm AJ, Northfiedl TL. Relation of *Helicobacter Pylori* infection and coronary heart disease. *Br Heart J* 1994;71:437-439.
6. Sephen DH, Malnick M, Sorel G, Avinoam K, Henry Schwars, Shlomo P, Aaron Mashiach, Zev S. Evaluation of carotid arterial plaques after endarterectomy for *Helicobacter Pylori* infection. Kaplan Medical Center. 1999; 1586-1857.
7. Cuffini, C. Guzmán L.A., Villegas, N. Et al. Isolation of *Chlamydia pneumoniae* from atheromas of the carotid artery and their antibiotics susceptibility profile. *Enferm. Infecc. Microbiol Clin* 2006; 24 (2): 81-5
8. Mobley, H.L.T., Island, M.D. & Hausinger, R.P. Molecular Biology of Microbial Ureasases, *Microbiol. Rev.* 59, 451-480 (1995).
9. Pasceri V, Cammarota G, Patti G, Cuoco L, Gasbarrini A, Grillo RL, Fideli G, Gasbarrini G, Maseri A. Association of virulent *H. Pylori* strains with ischemic heart disease. *Circulation.* 1998;97:1675-1679.
10. Labigne, A. & de Reuse, H. Determinants of *Helicobacter pylori* pathogenicity. *Infect. Agents Disease* 5, 191-202 (1996).
11. Atherton, J. C: et al. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter Pylori*. Association of a specific vac A types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J. Biol. Chem.* 270, 17771-17777 (1995).
12. Prevalence of *Helicobacter Pylori* infection and its link to coronary risk factors in Japanese patients with acute myocardial infarction. Kinjo K, Sato H, Sato H, Shiotani I, Ohnishi Y et al. *Circ J* 2002 Sep;66(9):805-10.
13. Infection and Atherosclerosis. Emg mechanistic paradigms. Stephen E. Epstein, MD; Yi Fu Zhou, MD; Jianhui Zhu, MD, PhD. *Circulation*, 1999;100: e20-e28.
14. Microbes, inflammation and atherosclerosis: will old pathology lessons guide new therapies? Vercellotti GM. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 2001; 112:215-22; Discussion 222-3.
15. Bedoya A, Garay J, Sanzon F et al. Histopathology of Gastritis in *Helicobacter Pylori*-infected children from populations at high and low gastric cancer risk. *Hum Pathol* 34:206-13,2003
16. Las causas y la prevención del cáncer gástrico. Correa Pelayo. Conferencia Ruy Perez Tamayo. Quito, Ecuador. Octubre, 2003
17. Detection of *Helicobacter Pylori* in Human Carotid Atherosclerotic Plaques. Sebastian Ameriso, MD; Esteban A. Fridman, MD; Ramón C. Leiguarda, MD; Gustavo E. Sevlever, MD. *Stroke.* 2001; 32:385-391.
18. Quin MT, Parthasarathy S, Fong L, Steinberg D. Oxidatively modified low density lipoproteins: a potential role in the recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84:2.995-2.998.
19. Parthasarathy S, Quinn MT, Schwenke DC, Carew TE, Steinberg D. Oxidative modification of beta-very density lipoprotein: potential role in monocyte recruitment and foam cell formation. *Arteriosclerosis* 1989; 9:398
20. Maas M, Krause E, Kruger S, Engel P, Bartels C. Direct demonstration of *Clamidia pneumoniae* in atherosclerotic lesions and in circulating blood cells (resumen 101). Yverdon-Les-Bains, Suiza: Fourth International Symposium of Modern

Concepts in Endocarditis and Cardiovascular Infections, Mayo de 1997

21. 50th Congress of the American College of Cardiology. Marzo de 2001. Andrew D. Michaels, Ariana Del Negro, Augustus O. Grant, Bramah N. Singh,

Christopher P Cannon, Eva Stein, Fahim Jafary, Gerald V. Naccarelli, John Gottdeiner, Jorge Plutzky, Ken Dauterman, Luis Gruberg, Marvin Moser, Murray Epstein, Peter R. Kowey, Phillip Sager, Raphael Rosenhek, Stephen Epstein, Warren J. Manning, William.