

Rev. Cienc. Tecnol.

Año 7 / N° 7a / 2005 / 87-94

DETECCIÓN MOLECULAR DE VIRUS HERPES SIMPLE EN MUESTRAS AÓRTICAS DE PACIENTES CON ATEROSCLEROSIS CORONARIA

¹D'Errico, R. A. / ²Gotti, A. / ²Gómez Moreno, J. / ¹Tonon, S. A.

¹Laboratorio de Biología Molecular Aplicada; Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, U.Na.M. Av. Mariano Moreno 1375, Posadas, Misiones (3300), Argentina.

²Fundación Cardiovascular de Misiones. Sgo. del Estero 2369, Posadas, Misiones (3300).

E-mail: labimap@escenf.unam.edu.ar

ABSTRACT

APPLICATION OF A MOLECULAR METHODOLOGY FOR THE DETECTION OF HERPES SIMPLEX VIRUS 1 AND 2 GENOME IN THE ANALYSIS OF AORTIC TISSUES FROM PACIENTS SUFFERING CORONARY ATHEROSCLEROSIS

Herpesviridae viruses have been proposed as potential risk factors for atherosclerosis since it was demonstrated that Marek's disease virus (MDV), an avian herpesvirus, could promote the development of atherosclerotic lesions in aortas of infected chickens. Experiments conducent to demonstrate the putative link between viral infection and atherosclerosis included -seroepidemiological studies, -animal models, and -*in vitro* studies. However, the obtained results are still controversial, banning still a definitive conclusion. One important issue regarding this controversy is that evidence of the actual presence of the virus at the site is scarce, although other mechanisms that do not require the presence of the virus in the vessel wall could exist. In this work, a molecular technique for the specific and sensitive detection of Herpes Simplex Virus (HSV) 1 and 2 genome in human tissue, based in nucleic acid amplification, is employed to test the presence of HSV-1 and HSV-2 in aortic tissue from thirty one severe atherosclerotic patients, who underwent coronary by-pass surgery. All the samples were negative by means of this experimental approach

KEY WORDS: HSV; atherosclerosis; molecular detection.

RESUMEN

Virus de la familia *Herpesviridae* han sido implicados como potenciales factores de riesgo en el desarrollo de la aterosclerosis coronaria. Sin embargo, diversos trabajos han arrojado resultados controversiales, por lo que aun no se ha podido arribar a una conclusión definitiva. Un punto importante en esta controversia radica en que existe muy poca evidencia directa que demuestre la presencia real del virus en el lugar de la lesión; sin embargo, no puede descartarse la posibilidad de que este agente actúe a través de mecanismos indirectos sin presencia del mismo en la pared vascular. En este trabajo se aplicó una técnica molecular para la detección tipo específica de Virus Herpes Simple 1 y 2 a partir de tejidos humanos. Con la misma se evaluó la potencial presencia de estos virus en tejidos aórticos provenientes de treinta y un pacientes con aterosclerosis coronaria severa. Las muestras analizadas fueron negativas.

PALABRAS CLAVES: HSV; aterosclerosis; detección molecular.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en la Argentina, y dentro de este conjunto de enfermedades, la aterosclerosis coronaria es la principal causa de infarto de miocardio [1, 2]. La formación de la placa aterosclerótica es un proceso complejo en el cual intervienen diversos tipos celulares y que involucra la interacción tanto de factores genéticos como ambientales. Actualmente se considera que la aterogénesis se produce básicamente por una sucesión de eventos inflamatorios, los cuales son inducidos inicialmente como una respuesta a un daño directo de la pared vascular.

En trabajos conducentes a dilucidar el posible mecanismo responsable del inicio de la lesión aterosclerótica, se identificaron diversos factores de riesgo; destacándose la hipercolesterolemia, el tabaquismo, la hipertensión y la diabetes. Sin embargo, hasta un 50% de los pacientes con aterosclerosis carecen de estos factores de riesgo "clásicos", lo que indicaría que los mismos no son suficientes para su desarrollo. Así, se sugiere que existirían otros factores sinérgicos involucrados que aún no han sido reconocidos, dentro de los cuales se encontrarían los agentes infecciosos [3, 4].

Los virus de la familia *Herpesviridae* han sido relacionados con la aterosclerosis como un posible iniciador de la lesión en la pared vascular a partir de estudios pioneros realizados por Fabricant *et al.* en la década del '70 [5, 6]. En estos trabajos, pollos infectados con el virus de la enfermedad de Marek (MDK), un herpesvirus aviano, desarrollaban lesiones en la arteria aorta similares histológicamente a las lesiones ateroscleróticas en humanos. Esto sucedía independientemente de si se les suministraba una dieta normal o hipercolesterolémica. Además, se encontraron antígenos virales específicos en las células musculares lisas de la pared aórtica y la inmunización previa de los pollos con el herpesvirus de pavo era capaz de prevenir a los mismos de la formación de la lesión [6, 7].

Otro modelo animal desarrollado para el estudio de la inducción de aterosclerosis por un herpesvirus, fue el de una línea de ratones con una delección completa del gen ApoE (ApoE ^{-/-}) [8]. Éstos presentan altos niveles de colesterol incluso con dietas normales, y desarrollan aterosclerosis espontáneamente. Para establecer la posible relación entre la infección herpesviral y la aterosclerosis, algunos ratones fueron infectados con un herpesvirus murino (MHV-68) capaz de establecer una infección latente. Los ratones ApoE ^{-/-} infectados desarrollaban lesiones ateroscleróticas más rápidamente que aquellos no infectados y, al final del período de estudio, las lesiones de los primeros eran considerablemente más exten-

sas. Además, pudo detectarse la presencia de ARNm viral en las arterias aortas de los ratones a los 5 días posinfección. Sin embargo, en un trabajo similar publicado posteriormente, la infección de ratones de la misma línea con el HSV tipo 1, a pesar de producir una respuesta inmune sistémica comparable a la provocada por la infección por MHV-68, no conducía a una aceleración del proceso aterogénico [9]. Tampoco pudo detectarse ARNm viral en el tejido aórtico de los ratones infectados, lo que indicaría que el montaje de una respuesta inmune no es suficiente para conducir al desarrollo de lesiones vasculares y probablemente sea necesaria la presencia real del virus en la pared vascular para poder causar un efecto directo.

Por otro lado, trabajos con líneas celulares humanas indican que el HSV es capaz de infectar células endoteliales [10-14] y células musculares lisas [15-17] provenientes de la pared vascular, confirmando que posee un tropismo por los tipos celulares que forman la pared arterial. En estos estudios, además, se observó que la infección por HSV provocaba una serie de cambios en el fenotipo celular que se pueden corresponder con características propias de la lesión aterosclerótica.

Entre estos podemos citar:

- un aumento en la expresión de receptores para el fragmento Fc de las IgG y para el componente C3 del complemento en las células endoteliales [10];

- un incremento en la adhesión de granulocitos y monocitos al endotelio [12, 14];

- un cambio en la actividad del endotelio que deja de tener una actividad anticoagulante para ser procoagulante, con un incremento en la generación de trombina y en la unión de plaquetas [11]; y

- un cambio en el metabolismo lipídico de las células musculares lisas, lo que provoca un aumento en la concentración de ésteres de colesterol y triglicéridos debido a una disminución en la actividad de las hidrolasas de ésteres de colesterol citoplasmáticas y lisosomales [16, 18, 19].

Estos resultados obtenidos *in vitro* condujeron a la realización de estudios seroepidemiológicos para establecer la posible relación entre la infección por HSV y el riesgo de contraer una enfermedad coronaria arterial.

Hasta la actualidad se han obtenido resultados contradictorios, principalmente en el análisis de los títulos de anticuerpos anti-HSV en poblaciones de pacientes con una enfermedad coronaria conocida [20, 3, 4]. Más aun, debido a que estos estudios son de corte transversal, no puede establecerse claramente una relación temporal entre el momento de la infección y la aparición de la enfermedad [21, 22]. Para intentar salvar esta cuestión se han realizado estudios epidemiológicos prospectivos. En dos

trabajos de este tipo no se ha encontrado una correlación entre altos niveles de anticuerpos séricos para HSV tipos 1 y 2 y un aumento del riesgo de un futuro evento aterotrombótico [23, 24]; mientras que en otro, a pesar de que se obtiene una correlación positiva, luego de realizar ajustes para otros factores de riesgo clásicos, dicha correlación no es significativa [25].

Así, se considera importante *poder determinar la presencia real del HSV en el sitio de la lesión como hecho necesario para su posible interacción con el metabolismo tisular*, sea esta por vía directa o indirecta.

Para ello se han aplicado diferentes estrategias experimentales, entre las cuales se destacan:

- la detección de la partícula viral por microscopía electrónica [26];
- la detección de genoma viral por hibridación *in situ* [15, 27]; y
- la detección de antígenos virales específicos por inmunodetección [28].

Con el advenimiento de técnicas moleculares amplificativas, se ha hecho posible la detección de ácidos nucleicos con extrema sensibilidad y especificidad. En el presente trabajo se puso a punto una técnica molecular para la detección tipo específica de genoma de HSV 1 y 2 en tejido humano, empleando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Además, se desarrolló un sistema basado en RFLP (polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción) para corroborar la identidad del producto amplificado. Posteriormente, se aplicó esta metodología a

muestras provenientes de pared aórtica de pacientes con aterosclerosis que habían sido sometidos a cirugía de revascularización miocárdica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Controles Virales

Los controles virales utilizados fueron gentilmente provistos por la Dra. Angélica Distéfano del Departamento de Virología del INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán" (Buenos Aires, Argentina). Estos consistían en sobrenadante de cultivo viral de HSV tipos 1 y 2 desnaturalizados por calentamiento y parcialmente purificados por centrifugación. Las concentraciones genómicas estimadas fueron de 350 ng/μl para HSV1 y de 225 ng/μl para HSV2.

Detección tipo específica de genoma viral

Para la detección tipo específica de genoma viral, se amplificaron mediante PCR fragmentos correspondientes a la región *Pol*, mediante una modificación¹ de la técnica original propuesta por do Nascimento *et al* [30]. Para ello se emplearon: -un cebador universal **HSV-U** (GAG CCA CTT CCA GAA GCG CAG) común para HSV tipos 1 y 2 y -dos cebadores, **HSV-1L** (GTT CGT CCT CGT CCT CCC C) y **HSV-2L** (GGC GCC TCC TTG TCG AG), específicos para cada tipo viral. Los fragmentos amplificados esperados fueron de 503 y 435 pares de bases (pb) para HSV tipo 1 y 2, respectivamente (Figura 1).

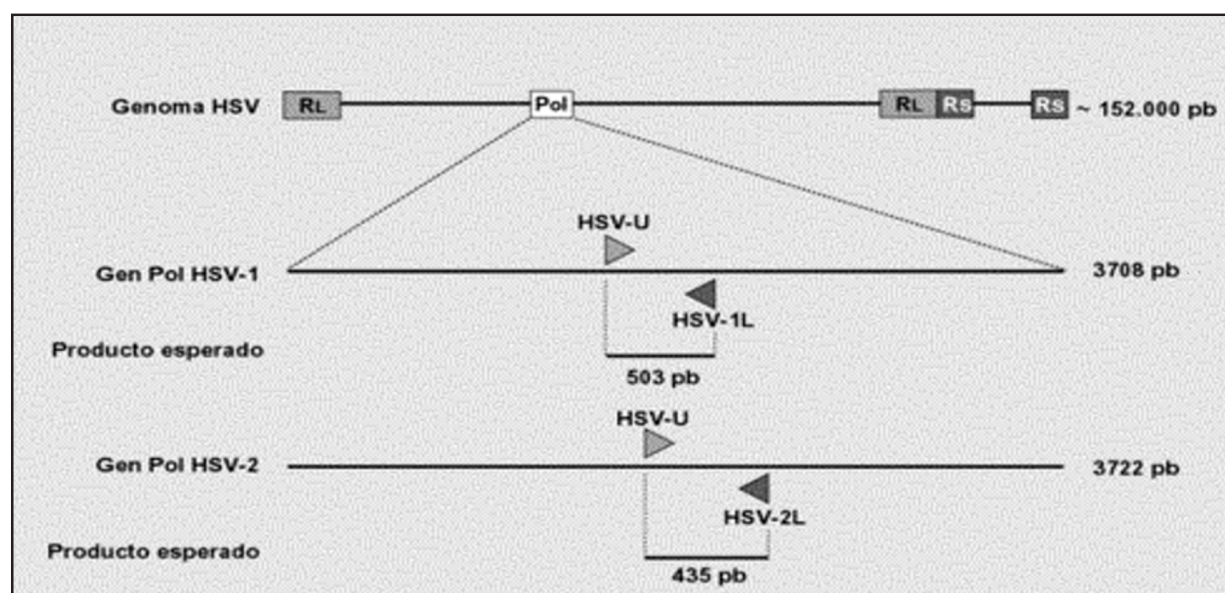


FIGURA 1: representación esquemática del genoma de HSV, destacando la posición relativa del gen *Pol*, blanco de la reacción de amplificación. Se destacan los cebadores empleados en las reacciones tipo-específicas (HSV-U/HSV-1L y HSV-U/HSV-2L) y sus correspondientes productos.

1- Esta incluyó cambios en concentraciones salinas, en cebadores, temperaturas de ciclado y un cambio nucleotídico en el cebador HSV-2L.

La mezcla de reacción para HSV-1 contenía 100 ng totales de genoma de muestra, 0,3 μ M de cada uno de los cebadores (HSV-U y HSV-1L), 2 mM de Cl_2Mg , 50 μ M de cada uno de los deoxinucleótidos, 50 mM de ClK, 10 mM de Tris-ClH y 0,1% de Tritón® X-100, en un volumen final de 25 μ l. Luego de un inicio *hot start* de 45 segundos a 94°C, se dispensaron 0,02 U/ μ l de *Taq pol* y se sometió la reacción a 40 ciclos de 45 seg. a 94°C, 45 seg. a 67°C y 45 seg. a 72°C.

Para HSV-2, se empleó una mezcla de reacción de composición semejante, excepto que contenía cebador HSV-2L, 100 ng totales de genoma de muestra y 3,5 mM de Cl_2Mg . En este caso, los 40 ciclos tenían el perfil 45 seg. a 94°C, 45 seg. a 69°C y 45 seg. a 72°C. La detección de los productos de amplificación se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,2% teñido con bromuro de etidio y observación bajo luz UV.

Confirmación de la identidad del producto amplificado mediante RFLP

Para la confirmación de la identidad de los fragmentos amplificados, se llevaron a cabo digestiones de los mismos empleando la enzima de restricción *Rsa I*, la cual genera un patrón de corte distintivo para los fragmentos HSV-1 y 2 (Figura 2).

La misma se realizó de acuerdo a las condiciones recomendadas por el proveedor, empleándose en cada reacción 1 μ g de ADN amplificado y 10 U de *Rsa I* (Promega R6371), en solución tampón pH 7,9 (10 mM Tris-ClH, 10

mM Cl_2Mg , 50 mM ClNa, 1 mM DTT). La mezcla de reacción se incubó durante 2 horas a 37°C. Los productos así obtenidos fueron detectados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio, y observados por transiluminación con luz UV.

Población analizada

La población analizada comprendió a 31 pacientes, edad promedio de 63,7 años (rango 39 a 78 años), de los cuales 9 fueron de sexo femenino y 22 masculino. El relevamiento de factores de riesgo clásicos presentó la siguiente distribución: -61% de dislipemia, -48% de tabaquismo, y -26% de diabetes no insulino dependiente. Además un 45% declaró un infarto de miocardio previo. Solo uno de ellos informó una infección previa por HSV. Se requirió del consentimiento individual de los participantes, previa información de las características del proyecto².

Obtención de muestras

Las muestras analizadas fueron porciones de pared vascular arterial tomadas aleatoriamente a partir de la aorta ascendente de individuos con enfermedad aterosclerótica coronaria. Las mismas se tomaron durante cirugía de revascularización miocárdica en el Instituto de Cardiología y Cirugía Cardiovascular Misiones, de Posadas, y en el Instituto del Corazón *Cordis* de Resistencia, Chaco, entre los meses de febrero y diciembre de 2001. El tejido se mantuvo en solución tampón PBS estéril a –

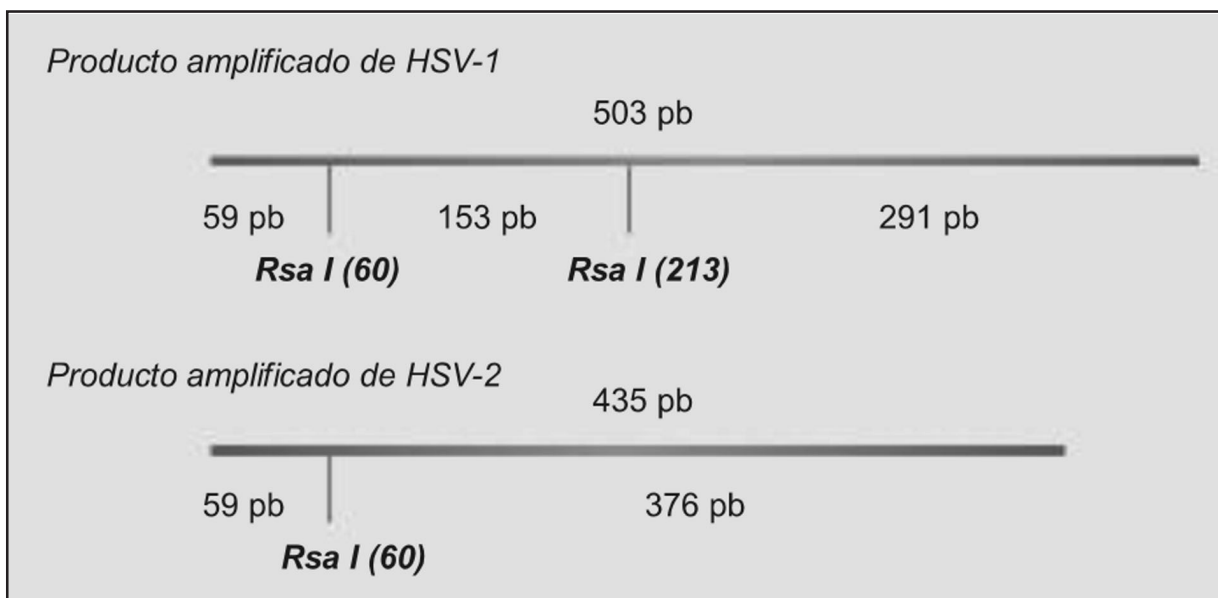


FIGURA 2: patrón de corte de los productos amplificados por PCR, mediante digestión enzimática con *Rsa*. La posición del sitio de reconocimiento se indica entre paréntesis, considerándose como punto de referencia la primer base del fragmento amplificado.

2- "Todas las investigaciones con sujetos humanos deben realizarse de conformidad con tres principios éticos fundamentales: respeto por las personas, beneficencia y justicia" (Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas, CIOMS).

20°C hasta el momento de su procesamiento. Por la metodología quirúrgica empleada, se desconoce si las muestras fueron tomadas precisamente a partir de la lesión aterosclerótica.

Extracción y purificación de ADN genómico total

El tejido fue seccionado con bisturí y degradado enzimáticamente mediante el método proteinasa K/SDS. Se emplearon 200 ng de proteinasa K por muestra, en un volumen final de 500 µl de buffer de digestión (100 mM ClNa, 10 mM Tris pH 8,3, 0,45% Tween 20 y 0,25% SDS). Se incubó durante 5 horas a 58°C, luego de lo cual se procedió a la inactivación térmica de la enzima.

A cada una de las muestras digeridas se le agregaron 2 µl de una solución de ARNasa (2 mg/ml en buffer TE) y se incubó por 30 minutos a 37°C para la eliminación del ARN presente. Subsecuentemente, la enzima fue inactivada por tratamiento térmico a 95°C durante 10 minutos.

Debido al alto contenido lipídico de las muestras, se realizó una doble purificación con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico 25:24:1, pH 8. Para ello se agregaron 100 µl de la solución de purificación a cada una de las muestras, se homogeneizó y luego se separaron las fases por centrifugación a máxima velocidad durante un minuto. Se tomaron 400 µl de la fase acuosa.

La precipitación proteica se llevó a cabo mediante la utilización de una solución salina concentrada provista por el kit Wizard® de Promega. Se agregaron 100 µl de misma y se agitó por 20 segundos, después de lo cual se dejaron en freezer por 3 minutos. Finalmente, se centrifugaron por 3 minutos a 13000 g.

Para la precipitación final del ADN total, se agregaron 20 µl de acetato de amonio 4 M y luego etanol absoluto frío hasta completar los 2 ml. Después de permitir la deshidratación del ADN en freezer por 30 minutos, las muestras se centrifugaron a 13000 g por 5 minutos. El botón de ADN obtenido fue rehidratado en 50 µl de buffer TE.

Las muestras se conservaron a -20°C hasta el momento de su análisis.

Cuantificación de ADN genómico total

La concentración de ADN obtenido y la pureza del mismo se determinó mediante barrido espectrofotométrico UV, de acuerdo a Berger [29].

RESULTADOS Y DISCUSION

Detección tipo específica de genoma de HSV en controles virales

Para establecer las condiciones óptimas de la técnica de PCR a utilizar, se emplearon controles genómicos pu-

ros de HSV tipos 1 y 2. Se evaluaron, principalmente, la concentración de Cl_2Mg y la temperatura de hibridación en el perfil de ciclado.

Luego de titular las concentraciones de Mg^{++} y adecuar la hibridación a cada par de cebadores, se establecieron los valores de 2 y 3,5 mM, y 67 y 69°C para los tipos 1 y 2, respectivamente.

Bajo estas condiciones de reacción, se corroboró la especificidad de los cebadores empleados, no observándose reacción cruzada en las amplificaciones y estableciéndose una total discriminación tipo específica, aún en reacciones *multiplex* (Figura 3).

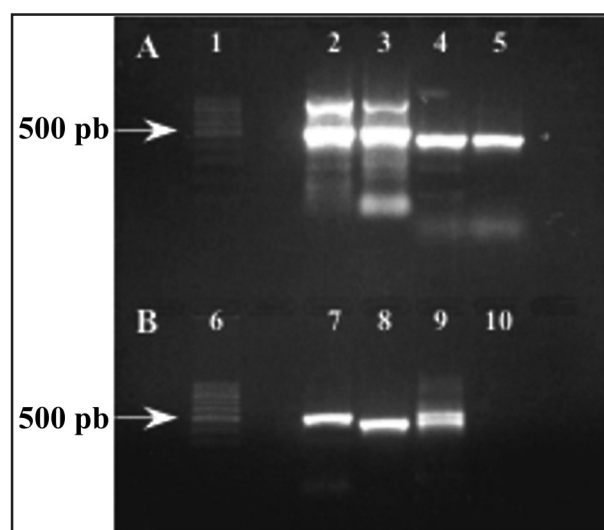


FIGURA 3: Electroforesis en gel de agarosa de productos de amplificación de controles virales, mediante la técnica empleada.

Calles 1 y 6: Marcador de peso molecular. **A) Calles 2 y 3:** Con cebadores HSV-U y HSV-1L; 35 y 3,5 ng de genoma HSV-1, respectivamente. **Calles 4 y 5:** Con cebadores HSV-U y HSV-2L 25 y 2,5 ng de genoma HSV-2, respectivamente. **B) Reacciones multiplex.** Con cebadores HSV-U, HSV-1L y HSV-2L. **Calle 7:** 3,5 ng de genoma HSV-1. **Calle 8:** 2,5 ng de genoma HSV-2. **Calle 9:** 3,5 ng de genoma HSV-1 y 2,5 ng de genoma HSV-2. **Calle 10:** Control negativo (agua).

Determinación del límite de detección de genoma viral por esta metodología

Para establecer el límite de detección de genoma viral por la metodología de amplificación molecular empleada, se realizaron cuatro series de diluciones sucesivas al 1/100 del stock viral inicial para cada tipo. El límite de detección determinado por titulación fue de $7 \cdot 10^{-5}$ ng para HSV tipo 1, y de $4,5 \cdot 10^{-5}$ ng para el tipo 2. Debido a que el tamaño aproximado del genoma viral de HSV es de 150 kpb, se puede estimar que la técnica utilizada es capaz de detectar, de manera inequívoca, el equivalente a $4 \cdot 10^2$ partículas virales de HSV tipo 1 y $2,7 \cdot 10^2$ partículas virales de HSV tipo 2.

Detección de genoma de HSV control en un contexto de genoma inespecífico

El límite de detección establecido para genoma viral puro fue corroborado en situaciones en donde el mismo se encontraba en un contexto complejo, mezclado con genoma inespecífico. Para ello, se realizaron nuevas reacciones de amplificación, en donde se utilizó como molde genoma de HSV tipo 1 o 2, a las concentraciones límite de detección, adicionándole 100 ng de genoma de espermatozoos de salmón sonicado. Esta mezcla compleja pretendería simular un ambiente de muestra biológica infectada.

Bajo estas condiciones no se observaron diferencias distinguibles en los resultados, detectándose bandas específicas bien definidas a las concentraciones límites de detección para cada tipo viral y estableciendo que la técnica utilizada tendría la suficiente especificidad y sensibilidad para el análisis de muestras biológicas (Figura 4).

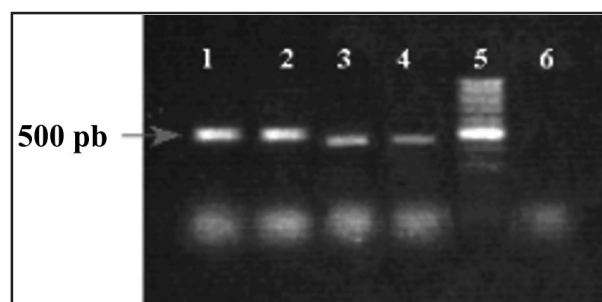


FIGURA 4: Electroforesis en gel de agarosa de productos de amplificación de controles virales más genoma inespecífico, mediante la técnica empleada.

Calle 1: 7×10^{-5} ng de genoma HSV-1. **Calle 2:** 7×10^{-5} ng de genoma HSV-1 más 100 ng de genoma de espermatozoos de salmón. **Calle 3:** $4,5 \times 10^{-5}$ ng de genoma HSV-2. **Calle 4:** $4,5 \times 10^{-5}$ ng de genoma HSV-2 más 100 ng de genoma de espermatozoos de salmón. **Calle 5:** Marcador de peso molecular. **Calle 6:** Control negativo (agua).

Posteriormente, este mismo experimento se repitió con 100 ng de ADN genómico humano proveniente de muestras de punch aórtico, obteniéndose resultados similares, validando la técnica empleada.

Autenticación del producto amplificado mediante RFLP

Con el objetivo de confirmar la identidad de los productos amplificados mediante PCR, se procedió al análisis de los amplicones generados a partir de cada uno de los controles virales, cuyas secuencias referencia fueron consultadas en la base de datos GenBank. Este análisis nos permitió determinar que el amplicón correspondiente a HSV-1 posee dos sitios de reconocimiento para la enzima de restricción *Rsa I*, mientras que el fragmento amplificado a partir de HSV-2 posee un único sitio de corte (Figura 2). Así, la digestión de los mismos por esta enzima permitiría corroborar su identidad generando un pa-

trón de corte distintivo, detectable mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%. El patrón de bandas obtenido luego de la digestión (Figura 5b), se corresponde completamente al esperado (Figuras 2 y 5a).

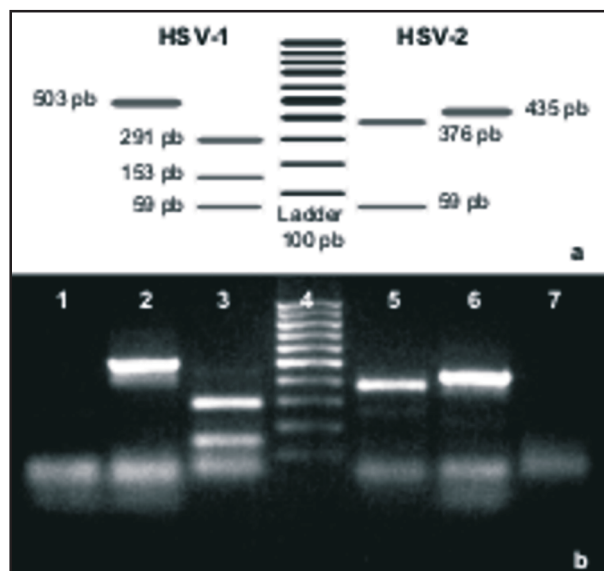


FIGURA 5: Electroforesis en gel de agarosa al 2% de productos de amplificación de virales, digeridos con la enzima de *Rsa* **a)** Esquema representativo de la fotografía mostrada en **b)**, de acuerdo al patrón de bandas esperado a partir de las secuencias consultadas en la base de datos GenBank. **b)** **Calle 1:** Control negativo (agua) para HSV-1. **Calle 2:** Producto de amplificación de 0,35 ng de genoma de HSV-1 sin digerir. **Calle 3:** Producto de amplificación de 0,35 ng de genoma de HSV-1 digerido con *Rsa* **Calle 4:** Marcador de peso molecular (escala de 100 pb). **Calle 5:** Producto de amplificación de 2,5 de genoma de HSV-2 digerido con *Rsa* **Calle 6:** Producto de amplificación de 2,5 ng de genoma de HSV-2 sin digerir. **Calle 7:** Control negativo (agua) para HSV-2.

Extracción y purificación de ADN genómico total a partir de muestras de tejido aórtico

Se compararon dos protocolos diferentes para la extracción y purificación del genoma a partir de tejido aórtico. En una primera instancia se utilizó el kit Wizard de Promega de la manera descrita por el proveedor. Sin embargo, debido a la alta concentración de lípidos característica de este tipo de muestra, el rendimiento de extracción ($153,96 \text{ ng}/\mu\text{l}$, $\sigma=65,27$) y la pureza del genoma (índice $A_{260}/A_{280} = 1,18$, $\sigma=0,14$) fue pobre. Así, se incluyó una doble purificación fenólica al mismo, de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos. Con esta modificación se obtuvieron en promedio $410,26 \text{ ng}/\mu\text{l}$ de ADN ($\sigma=255,27$) con un índice A_{260}/A_{280} de $1,38$ ($\sigma=0,11$).

Detección de genoma de HSV tipos 1 y 2 en muestras de tejido aórtico

Con esta técnica se analizó la potencial presencia de genoma de HSV tipos 1 y 2 en la población de pacientes ateroscleróticos bajo análisis. El *control positivo* de cada grupo de reacciones de amplificación consistió en

100 ng de ADN genómico humano normal más genoma puro de HSV tipo 1 o 2 control, a la concentración límite de detección. Como *controles negativos*, se emplearon s agua, y s 100 ng de ADN genómico humano normal, sin el agregado de genoma de HSV.

En ninguna de las 31 muestras analizadas se detectó la presencia de genoma de HSV (Figuras 6 y 7).

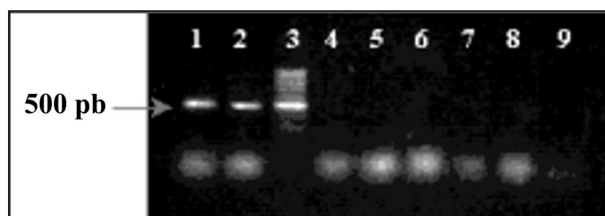


FIGURA 6: Electroforesis en gel de agarosa de productos de amplificación de muestras para la detección de genoma de HSV-1, mediante la técnica empleada. **Calle 1:** Control positivo (7×10^{-5} ng de genoma HSV-1). **Calle 2:** Control positivo (7×10^{-5} ng de genoma HSV-1 más 100 ng de ADN genómico humano). **Calle 3:** Marcador de peso molecular. **Calles 4 a 8:** 100 ng de ADN genómico de muestras. **Calle 9:** Control negativo (agua).

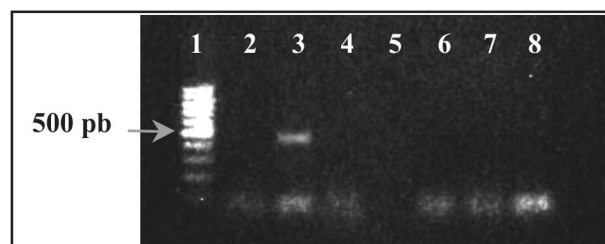


FIGURA 7: Electroforesis en gel de agarosa de productos de amplificación de muestras para la detección de genoma de HSV-2, mediante la técnica aplicada. **Calle 1:** Marcador de peso molecular. **Calle 2:** Control negativo (agua). **Calle 3:** Control positivo ($4,5 \times 10^{-5}$ ng de genoma HSV-2 más 100 ng de ADN genómico humano). **Calles 4 a 8:** 100 ng de ADN genómico de muestras.

En la interpretación de estos resultados se debe considerar que la naturaleza particular de las muestras bajo análisis (*punch* aórtico aleatorio) no permite establecer con certeza que estas contengan regiones que incluyan placas ateroscleróticas, las cuales pueden presentarse en otras áreas de la pared vascular.

Por otro lado, es factible que el agente infeccioso pueda mediar el desarrollo de la placa aterosclerótica por mecanismos indirectos. Esta última hipótesis está apoyada en experimentos con ratas infectadas con otro miembro de la familia *Herpesviridae*, el Citomegalovirus, el que producía una aceleración en el desarrollo de la aterosclerosis en dichos animales, sin que sea necesaria la presencia del mismo en el sitio de la lesión [31].

Si bien la controversia sobre el rol de infección viral aórtica por HSV y génesis de placa aterosclerótica es un tema de debate actual, nuestra aproximación experimental no detectó presencia de genoma viral en tejido aórtico de pacientes con aterosclerosis que habían sido sometidos a cirugía de revascularización miocárdica. ●

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Castillo, S.; Coniglio, R. I.; Doubnia, M. I.; López Torres, J.; Guersanik, C. S.; Meza, G.; Claramaunt, R.; Durando, A.; Ramírez, R.; Silva, E.; D'alonzo, T. *Factores de riesgo para la aterosclerosis coronaria en el nordeste argentino. Dieta alimentaria y nivel de instrucción*. Revista de Ciencia y Tecnología. 2000;6-16.
2. Ministerio de Salud de la Nación. Boletín del Programa Nacional de Estadísticas de Salud: *Agrupamiento de causa de mortalidad, por división política territorial, edad y sexo, Argentina 2000*. 2002.
3. Nicholson, A. C.; Hajjar, D. P. *Herpesviruses in atherosclerosis and thrombosis: etiologic agents or ubiquitous bystanders*. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 1998; 18:339-348.
4. Epstein, S. E.; Zhou, Y. F.; Zhu, J. *Infection and atherosclerosis: emerging mechanistic paradigms*. Circulation. 1999; 100:e20-e28.
5. Fabricant, C. G.; Krook, L.; Gillespie, J. H. *Virus-induced cholesterol crystals*. Science. 1973; 181:566-567.
6. Fabricant, C. G.; Fabricant, J.; Litrenta, M. M.; Minick, C. R. *Virus-induced atherosclerosis*. J. Exp. Med. 1978; 148:335-340.
7. Fabricant, C. G.; Fabricant, J.; Minick, C. R.; Litrenta, M. M. *Herpesvirus-induced atherosclerosis in chickens*. Fed. Proc. 1983; 42:2476-2479.
8. Alber, D. G.; Powell, K. L.; Vallance, P.; Goodwin, D. A.; Graham-Clarke, C. *Herpesvirus infection accelerates atherosclerosis in the apolipoprotein E-deficient mouse*. Circulation. 2000; 102:779-785.
9. Alber, D. G.; Vallance, P.; Powell, K. L. *Enhanced atherogenesis is not an obligatory response to systemic herpesvirus infection in the apoE-deficient mouse: comparison of murine gamma-herpesvirus-68 and herpes simplex virus-1*. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2002; 22:793-798.
10. Cines, D. B.; Lyss, A. P.; Bina, M.; Corkey, R.; Kefalides, N. A.; Friedman, H. M. *Fc and C3 receptors induced by Herpes Simplex Virus in cultured human endothelial cells*. J. Clin. Invest. 1982; 69:123-128.
11. Visser, M. R.; Tracy, P. b.; Vercellotti, G. M.; Goodman, J. L.; White, J. G.; Jacob, H. S. *Enhanced thrombin generation and platelet binding on herpes simplex virus-infected endothelium*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1988; 85:8227-8230.

12. Zajac, B. A.; O'Neill, K.; Friedman, H. M.; Mac Gregor, R. R.
Increased adherence of human granulocytes to Herpes Simplex Virus type 1 infected endothelial cells. In Vitro Cell. Dev. Biol. 1988; 24:321-325.
13. Friedman, H. M.
Infection of endothelial cells by common human viruses. Rev. Infect. Dis. 1989; 11:s700-s704.
14. Span, A. H. M.; Endert, C. P. A.; van Boven, C. P. A.; Bruggeman, C. A.
Virus induced adherence of monocytes to endothelial cells. FEMS Microbiol. Immunol. 1989; 47:237-244.
15. Benditt, E. P.; Barrett, T.; McDougall, J. K.
Viruses in the aetiology of atherosclerosis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1983; 80:6386-6389.
16. Hajjar, D. P.
Herpesvirus infection prevents activation of cytoplasmic cholesteryl esterase in arterial smooth muscle cells. J. Biol. Chem. 1986; 261:7611-7614.
17. Kaner, R. J.; Medina, J.; Nicholson, A. C.; Ursea, R.; Schwartz, S. M.; Hajjar, D. P.
Developmentally regulated herpesvirus plaque formation in arterial smooth muscle cells. Circ. Res. 1993; 73:10-14.
18. Hajjar, D. P.; Pomerantz, K. B.; Falcone, D. J.; Weksler, B.B.; Grant, A. J.
Herpes Simplex Virus infection in human arterial cells. Implications in arteriosclerosis. J. Clin. Invest. 1987; 80:1317-1321.
19. Hajjar, D. P.
Oxidized lipoproteins and infectious agents: are they in collusion to accelerate atherogenesis. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2000; 20:1421-1422.
20. Kaner, R. J.; Hajjar, D. P.
Viral activation of thrombo-atherosclerosis. En: *Atherosclerosis and coronary artery disease.* Fuster, V.; Ross, R.; Topol, E. J.; eds. Philadelphia: Lippincott Raven Publishers; 1996:569-584.
21. Epstein, S. E.; Zhu, J.
Lack of association of infectious agents with risk of future myocardial infarction and stroke: definitive evidence disproving the infection/coronary artery disease hypothesis? Circulation. 1999; 100:1366-1368.
22. Morré, S. A.; Stooker, W.; Lagrand, W. K.; van den Brule, A. J. C.; Niessen, H. W. M.
Microorganisms in the aetiology of atherosclerosis. J. Clin. Pathol. 2000; 53:647-654.
23. Ridker, P. M.; Hennekens, C. H.; Stampfer, M. J.; Wang, F.
Prospective study of herpes simplex virus, cytomegalovirus, and the risk of future myocardial infarction and stroke. Circulation. 1998; 98:2796-2799.
24. Sorlie, P. D.; Nieto, F. J.; Adam, E.; Folsom, A. R.; Shahar, E.; Massing, M.
A prospective study of cytomegalovirus, herpes simplex virus 1, and coronary heart disease: the atherosclerosis risk in communities (ARIC) study. Arch Intern Med. 2000; 160:2027-2032.
25. Zhu, J.; Nieto, F. J.; Horne, B. D.; Anderson, J. L.; Muhlestein, J. B.; Epstein, S. E.
Prospective study of pathogen burden and risk of myocardial infarction or death. Circulation. 2001; 103:45-51.
26. Gyorkey, F.; Melnick, J. L.; Guinn, G. A.; Gyorkey, P.; DeBaakey, M. E.
Herpesviridae in the endothelial and smooth muscle cells of the proximal aorta in arteriosclerotic patients. Exp Mol Pathol. 1984; 40:328-339.
27. Yamashiroya, H. M.; Ghosh, L.; Yang, R.; Robertson, A. L. Jr.
Herpesviridae in the coronary arteries and aorta of young trauma victims. Am J Pathol. 1988; 130:71-79.
28. Raza-Ahmad, A.; Klassen, G. A.; Murphy, D. A.; Sullivan, J. A.; Kinley, C. E.; Landymore, R. W.; Wood, J. R.
Evidence of type 2 herpes simplex infection in human coronary arteries at the time of coronary artery bypass surgery. Can J Cardiol. 1995; 11:1025-1029.
29. Berger, S. L.
Quantifying 32P-labeled and unlabeled nucleic acids. En: *Methods in enzymology.* Berger, S. L., Kimmel, A. R., eds. Orlando, San Diego, New York, Austin, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto: Academic Press Inc. Harcourt Brace Jovanovich; 1987:49-54.
30. Do Nascimento, M. C.; Sumita, L. M.; de Souza, V. A. U. F.; Pannuti, C. S.
Detection and direct typing of herpes simplex virus in perianal ulcers of patients with AIDS by PCR. J. Clin. Microbiol. 1998; 36:848-849.
31. Zhou, Y. F.; Shou, M.; Guetta, E.; Guzman, R.; Unger, E. F.; Yu, Z. X.; Zhang, J.; Finkel, T.; Epstein, S. E.
Cytomegalovirus infection of rats increases the neointimal response to vascular injury without consistent evidence of direct infection of the vascular wall. Circulation. 1999; 100:1569-1575.

Recibido: 15 de Febrero de 2005.

Aprobado: 18 de Agosto de 2005.