UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Possível envolvimento da *Chlamydia pneumoniae* e
Mycoplasma pneumoniae na resposta inflamatória da
aterosclerose

Renata Melo de Assis

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Profº. Tit. Mario H. Hirata

São Paulo
2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Possível envolvimento da *Chlamydia pneumoniae* e *Mycoplasma pneumoniae* na resposta inflamatória da aterosclerose

Renata Melo de Assis

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Farmacêuticas da Universidade de
São Paulo para obtenção do grau de
MESTRE

Área de concentração: Análises Clínicas
Orientador: Profº. Tit. Mario H. Hirata

São Paulo
2008

DEDALUS - Acervo - CQ

30100013592

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

A848p Assis, Renata Melo de
Possível envolvimento da *Chlamydia pneumoniae* e *Mycoplasma pneumoniae* na resposta inflamatória da aterosclerose / Renata Melo de Assis. -- São Paulo, 2008.
133p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientador: Hirata, Mario Hiroyuki

1. Diagnóstico molecular : Medicina 2. Bioquímica clínica : Medicina 3. Imunopatologia I. T. II. Hirata, Mario Hiroyuki, orientador.

616.0756 CDD

Renata Melo de Assis

Possível envolvimento da *Chlamydia pneumoniae* e *Mycoplasma pneumoniae* na resposta inflamatória da aterosclerose

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profº. Tit. Mario H. Hirata
Orientador/Presidente

Ligia Ferreira Gomes
1º Examinador

Adriana Augusto de Rezende
2º Examinador

São Paulo, 20 de junho de 2008

DEDICATÓRIA

A Deus e a minha grande família, especialmente aos meus queridos pais, Assis e Diana, pelo incentivo e apoio em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em nome de sua Diretora, Prof^a. Tit. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto.

Ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em nome de seu chefe, Prof^a. Tit. Dulcinéia S. P. Abdalla.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-graduação em Farmácia – Área de Análises Clínicas, do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Ao Prof^o. Tit. Mario H. Hirata e a Prof^a. Assoc. Rosario D. C. Hirata pelas orientações recebidas.

A Prof^a. Dr^a. Maria de Lourdes Higuchi, diretora do Departamento de Anatomia Patológica do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela orientação recebida.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular Aplicado ao Diagnóstico, especialmente àqueles que me incentivaram, apoiaram e concederam explicações fundamentais para o bom desempenho no laboratório e execução das técnicas de Biologia Molecular empregadas.

A todos os funcionários do Departamento de Anatomia Patológica do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, particularmente àqueles que colaboraram na aplicação das técnicas de Imunohistoquímica e Hibridização *in situ*.

Aos meus familiares e amigos que me incentivaram e torceram positivamente por mim.

"Jamais confunda conhecimento com sabedoria. Um o ajuda a ganhar uma vida, o outro, a construir uma vida."

Sandra Carey

RESUMO

A aterosclerose é um processo complexo, multifatorial que ainda não está totalmente esclarecido. Foi proposto que a resposta imune mediada por processos infecciosos e/ou inflamatórios influencia na patogênese de lesões ateroscleróticas. Os receptores *Toll-like* (TLRs) estão envolvidos na resposta inata e em outros eventos fisiológicos através da interação com seus ligantes endógenos e exógenos e talvez envolvidos no processo aterogênico. Tem por objetivo analisar a expressão dos receptores *Toll-like* 2 e 4 (TLR2 e TLR4) associando o processo de sinalização com a presença de agentes infecciosos tais como a *Chlamydia pneumoniae* (CP) e *Mycoplasma pneumoniae* (MP), em pacientes com infarto do miocárdio (MI) e em aneurismas aórticos. Foram obtidos fragmentos de aortas ascendentes de pacientes submetidos à cirurgia de revascularização do miocárdio (G1, n=13) e de fragmentos de pacientes submetidos à cirurgia de correção de aneurisma aórtico (G2, n=14). Amostras congeladas e parafinadas foram analisadas por Imunohistoquímica (IHQ) e Hibridização *in situ* (HIS) para detecção e localização da presença dos patógenos e TLRs. Realizou-se uma semiquantificação em microscópio (0, ausente; 1, discreto e focal; 2, moderado e focal e 3, intenso e difuso). Observou-se o grau de inflamação e de acúmulo de gordura. Outrossim, realizou-se PCR em tempo real (SYBR Green) para pesquisa de DNA de CP e MP, como também análise da expressão de mRNA de TLR2 e de TLR4. Na IHQ, constatou-se presença de MP, CP, TLR2 e TLR4 (G1 e G2), maior quantidade de MP ($p=0,012$) e de TLR4 ($p=0,017$) no G2. Houve correlação de CP com MP ($r=0,810$ e $p=0,003$) e de TLR2 com TLR4 ($r=0,569$ e $p=0,034$). Na HIS, constatou-se presença de MP, CP, TLR2 e TLR4 (G1 e G2), não houve diferenças significativas comparando-se os grupos (G1 x G2), porém houve correlação, no G1, de CP com TLR4 ($r=0,730$ e $p=0,040$) e de infiltrado inflamatório com células adiposas ($r=0,700$ e $p=0,036$). No G2, houve várias correlações: MP com CP ($r=0,620$ e $p=0,016$), MP com TLR4 ($r=0,662$ e $p=0,010$), CP com TLR2 ($r=0,733$ e $p=0,003$), CP com TLR4 ($r=0,589$ e $p=0,027$) e de TLR2 com TLR4 ($r=0,714$ e $p=0,004$). A PCR em tempo real mostrou presença de CP, pela segunda extração de DNA realizada (G2). Não houve diferença de expressão dos TLRs entre os grupos. A expressão de TLR2 foi maior do que de TLR4 no G1 ($p=0,006$). O grau de inflamação e o acúmulo de gordura foram maiores no G2 do que no G1 ($p=0,001$). Estes dados sugerem uma relação da co-infecção CP e MP, na gravidade do processo inflamatório presente em placas ateroscleróticas e em pacientes com infarto do miocárdio, como também, participação dos receptores *Toll-like* 2 e 4.

Palavras-chave: Receptores *Toll-like*. *Chlamydia pneumoniae*. *Mycoplasma pneumoniae*. Aterosclerose. PCR em tempo real.

ABSTRACT

The atherosclerosis is a complex and multifactorial process that is not still completely elucidated. It has been proposed that immune-mediate response to inflammatory and/or infectious processes is implicated in the pathogenesis of the atherosclerotic lesions. Toll-like receptors (TLRs) are involved in the innate response and other physiological events through binding to endogenous and exogenous ligands and it maybe involved in the atherogenic process. To investigate the Toll-like receptor 2 (TLR2) and Toll-like receptor 4 (TLR4) expression in atheroma plaques and its association with the presence of infectious agents such as *Chlamydia pneumoniae* (CP) and *Mycoplasma pneumoniae* (MP) in patients with myocardial infarction (MI) and aortic aneurysms. Fragments of ascending aorta were obtained from MI patients submitted to surgeries of revascularization of the myocardium (G1, n=13) and correction of aortic aneurism (G2, n=14). Frozen and paraffined samples slices were analyzed by Immunohistochemistry (IHQ) and in situ Hybridization for detection and localization of TLR2 and TLR4 expression and CP and MP antigens. There was semiquantification in microscope (0, absent; 1, discrete and focal; 2, moderate and focal; and 3, intense and diffuse). Histopathology was also carried out to investigate the inflammation degree and fat accumulation in these tissues. Real time PCR using SYBR Green System detection was used to study DNA CP and MP, also to analyze expression of mRNA TLR2 and TLR4. Using IHQ, it was verified presence of MP, CP, TLR2 and TLR4 (G1 and G2), larger amount of MP ($p=0.012$) and TLR4 ($p=0.017$) in G2. In G1 group, MP was positively correlated with CP ($r=0.810$, $p=0.003$), in G2, TLR2 with TLR4 ($r=0.569$, $p=0.034$). Using HIS, it was verified presence of MP, CP, TLR2 and TLR4 (G1 and G2), there were not significant differences between groups (G1 x G2), however, It was shown correlation between in G1, CP with TLR4 ($r=0.730$, $p=0.040$) and also inflammation with fat accumulation ($r=0.700$, $p=0.036$). In G2, there were several correlations: presence of MP with CP ($r=0.620$, $p=0.016$), MP with TLR4 ($r=0.662$, $p=0.010$), CP with TLR2 ($r=0.733$, $p=0.003$), CP with TLR4 ($r=0.589$, $p=0.027$) and TLR2 with TLR4 ($r=0.714$, $p=0.004$). Real time PCR showed presence of CP DNA using second purification accomplished (G2). There was not difference of expression TLRs among the groups. The expression of TLR2 was higher than TLR4 in G1 ($p=0.006$). Increased degree of inflammation and fat accumulation was also find in G2 than in G1 ($p=0.001$). These results are suggesting that the gravity of the inflammatory process in atherosclerotic plaques strongly are related to the presence of MP and CP co infection and expression of TLR2 and TLR4, as well in MI patients under myocardial revascularization.

Keywords: Toll-like receptors. *Chlamydia pneumoniae*. *Mycoplasma pneumoniae*. Atherosclerosis. Real time PCR.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Evidências experimentais sugerindo o envolvimento dos TLRs em doenças crônicas inflamatórias	29
Tabela 2	– Associação da <i>C. pneumoniae</i> com a aterosclerose	34
Tabela 3	– Seqüência das sondas utilizadas na HIS	43
Tabela 4	– Iniciadores utilizados nas reações de PCR	50
Tabela 5	– Iniciadores utilizados na reação de PCR em tempo real	53
Tabela 6	– Iniciadores utilizados como controle de qualidade	57
Tabela 7	– Análise descritiva dos valores obtidos na camada íntima	61
Tabela 8	– Análise descritiva dos valores obtidos na camada adventícia	62
Tabela 9	– Análise descritiva e comparação entre as camadas aórticas e entre os grupos G1 versus G2 para IHQ	65
Tabela 10	– Comparação entre os agentes infecciosos em cada grupo de estudo	66
Tabela 11	– Comparação entre os TLRs em cada grupo de estudo	66
Tabela 12	– Correlações no grupo 1 (aortas ascendentes) entre o infiltrado inflamatório versus gordura (células adiposas), infiltrado inflamatório versus agentes infecciosos, infiltrado inflamatório versus Receptores <i>Toll-like</i> , gordura versus agentes infecciosos, gordura versus Receptores <i>Toll-like</i> , agentes infecciosos entre si, agentes infecciosos versus Receptores <i>Toll-like</i> e Receptores <i>Toll-like</i> entre si	68
Tabela 13	– Correlações no grupo 2 (aneurisma) entre o infiltrado inflamatório versus gordura (células adiposas), infiltrado inflamatório versus agentes infecciosos, infiltrado inflamatório versus Receptores <i>Toll-like</i> , gordura versus agentes infecciosos, gordura versus Receptores <i>Toll-like</i> , agentes infecciosos entre si, agentes infecciosos versus Receptores <i>Toll-like</i> e Receptores <i>Toll-like</i> entre si	70
Tabela 14	– Análise descritiva dos valores obtidos na camada íntima para HIS	72
Tabela 15	– Análise descritiva dos valores obtidos na camada adventícia para HIS	73
Tabela 16	– Análise descritiva e comparação entre as camadas aórticas e entre os grupos G1 versus G2 para HIS	76
Tabela 17	– Comparação entre os agentes infecciosos em cada grupo de estudo para HIS	76
Tabela 18	– Comparação entre os Receptores <i>Toll-like</i> em cada grupo de estudo na HIS	77

Tabela 19 – Correlações, de HIS, no grupo 1 (aortas ascendentes) entre o infiltrado inflamatório versus gordura (células adiposas), infiltrado inflamatório versus agentes infecciosos, infiltrado inflamatório versus Receptores <i>Toll-like</i> , gordura versus agentes infecciosos, gordura versus Receptores <i>Toll-like</i> , agentes infecciosos entre si, agentes infecciosos versus Receptores <i>Toll-like</i> e Receptores <i>Toll-like</i> entre si	79
Tabela 20 – Correlações, de HIS, no grupo 2 (aneurismas) entre o infiltrado inflamatório versus gordura (células adiposas), infiltrado inflamatório versus agentes infecciosos, infiltrado inflamatório versus Receptores <i>Toll-like</i> , gordura versus agentes infecciosos, gordura versus Receptores <i>Toll-like</i> , agentes infecciosos entre si, agentes infecciosos versus Receptores <i>Toll-like</i> e Receptores <i>Toll-like</i> entre si	82
Tabela 21 – Análise descritiva e comparação entre os grupos G1 versus G2 para infiltrado inflamatório e células adiposas	83
Tabela 22 – Comparação entre as técnicas de Imunohistoquímica e Hibridização <i>in situ</i> , nos grupos analisados	85
Tabela 23 – Análise descritiva para expressão de mRNA dos TLRs e comparação entre os grupos	88
Tabela 24 – Correlações entre os receptores <i>Toll-like</i> entre si nos diferentes grupos	90

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Participação da inflamação em todos os estágios da aterosclerose. A) Recrutamento de leucócitos. B) Formação das células espumosas e entrada de linfócitos T. C) Ruptura da placa fibrótica e formação de trombo	19
Figura 2	– Ligantes dos TLRs. Abreviações: dsRNA, RNA dupla-fita; LPS, lipopolissacarídeo; GIPLs, glicolipídeos; PAMP, padrão molecular associado à patógenos; RSVF, <i>respiratory syncytial virus fusion</i> ; ssRNA, RNA fita simples; TLR, Toll-like receptor	25
Figura 3	– Cascata da sinalização mediada pelos TLRs	27
Figura 4	– Potenciais mecanismos das infecções no desenvolvimento da aterosclerose	31
Figura 5	– Proporção dos antígenos <i>M. pneumoniae</i> , <i>C. pneumoniae</i> , TLR2 e TLR4 na camada íntima das aortas estudadas	63
Figura 6	– Proporção dos antígenos <i>M. pneumoniae</i> , <i>C. pneumoniae</i> , TLR2 e TLR4 na camada adventícia das aortas estudadas	63
Figura 7	– Proporção dos antígenos <i>M. pneumoniae</i> , <i>C. pneumoniae</i> , TLR2 e TLR4 na camada íntima nos grupos 1 e 2	64
Figura 8	– Proporção dos antígenos <i>M. pneumoniae</i> , <i>C. pneumoniae</i> , TLR2 e TLR4 na camada adventícia nos grupos 1 e 2	64
Figura 9	– Proporção dos genes <i>M. pneumoniae</i> , <i>C. pneumoniae</i> , TLR2 e TLR4 na camada íntima das aortas estudadas para técnica de HIS	74
Figura 10	– Proporção dos genes <i>M. pneumoniae</i> , <i>C. pneumoniae</i> , TLR2 e TLR4 na camada adventícia das aortas estudadas para técnica de HIS	74
Figura 11	– Proporção dos genes <i>M. pneumoniae</i> , <i>C. pneumoniae</i> , TLR2 e TLR4 na camada íntima nos grupos 1 e 2 para reação de HIS	75
Figura 12	– Proporção dos genes <i>M. pneumoniae</i> , <i>C. pneumoniae</i> , TLR2 e TLR4 na camada adventícia nos grupos 1 e 2 para reação de HIS	75
Figura 13	– Diferença da quantidade de inflamação entre os grupos de estudo	84
Figura 14	– Diferença da quantidade de gordura entre os grupos de estudo	84
Figura 15	– Fotomicrografia de fragmentos de aortas ascendentes e de aneurismas aórticos submetidos à técnica de Imunoperoxidase e de Hibridização <i>in situ</i> , exibindo a camada íntima ou adventícia	86

Figura 16 – Expressão de mRNA de TLR2 nos grupos de estudo	88
Figura 17 – Expressão de mRNA de TLR4 nos grupos de estudo	89
Figura 18 – Expressão de mRNA de TLR2 e TLR4 nos grupos de estudo, em gráfico de perfis de média, com dois erros-padrão	89
Figura 19 – Expressão de mRNA de TLR2 e TLR4 nos grupos de estudo, em dispersão	90
Figura 20 – Contraprova da PCR em tempo real para o <i>M. pneumoniae</i> apresentando amplificação (curvas semi-logarítmicas) das amostras contendo DNA do <i>M. pneumoniae</i>	92
Figura 21 – Pesquisa de <i>C. pneumoniae</i> nas amostras do grupo 2 (Kit QIAamp)	92
Figura 22 – Pesquisa de <i>C. pneumoniae</i> nas amostras do grupo 2 (Fenol/clorofórmio) .	93
Figura 23 – Pesquisa de <i>C. pneumoniae</i> nas amostras do grupo 2 (SDS)	93
Figura 24 – Pesquisa de <i>C. pneumoniae</i> nas amostras do grupo 2 (Triton)	93

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Apo A	– Apolipoproteína A
Apo B	– Apolipoproteína B
Apo E	– Apolipoproteína E
Apo E -/-	– Apolipoproteína E deficiente
APCs	– Células apresentadoras de antígenos
BSA	– Albumina sérica bovina
CE	– Células endoteliais
cDNA	– Ácido desoxirribonucléico complementar
CD40	– Receptor encontrado em células apresentadoras de antígenos
CHSP60	– Proteína de choque térmico clamidial 60
CP	– <i>Chlamydia pneumoniae</i>
CRP	– Proteína-C reativa
Ct	– Ciclo de Treshold
DAC	– Doença arterial coronariana
dUTP	– Deoxi-uridina 5'-trifosfato
DCV	– Doença cardiovascular
DEPEC	– Dietilpirocarbonato
DNA	– Ácido desoxirribonucléico
dNTP	– Desoxirribonucleotídeo 5'-trifosfato
DP	– Desvio-padrão
dsRNA	– Ácido ribonucléico dupla-fita
ECA	– Enzima conversora de angiotensina
EDA	– Domínio extra A da fibronectina
EDTA	– Ácido tetracético etilenodiamino
G1	– Grupo 1(aortas ascendentes)
G2	– Grupo 2 (aneurismas aórticos)
GAPDH	– Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GIPLs	– Glicolipídeos
GM-CSFs	– Fatores estimulatórios de colônias monócito-granulócito
HC/FMUSP	– Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

HDL	– Lipoproteína de alta densidade
HIS	– Hibridização <i>in situ</i>
HSP60	– Proteína de choque térmico 60
ICAM-1	– Molécula de adesão intercelular – 1
IgG	– Imunoglobulina G
IHQ	– Imunohistoquímica
IL-1	– Interleucina 1
IL-1 β	– Interleucina 1 beta
IL-4	– Interleucina 4
IL-6	– Interleucina 6
IL-8	– Interleucina 8
IFN- γ	– Interferon gama
InCOR	– Instituto do Coração
Kb	– Quilobases
KCl	– Cloreto de potássio
LAMPs	– Proteínas de membranas associadas aos lipídeos
LDL	– Lipoproteína de baixa densidade
LDL-c	– Colesterol da lipoproteína de baixa densidade
LDL-ox	– Lipoproteína de baixa densidade-oxidada
Lp (a)	– Lipoproteína (a)
LPS	– Lipopolissacarídeo
LTA	– Ácido lipoteicóico
Mal	– Adaptador tipo MyD88
MgCl ₂	– Cloreto de magnésio
MIP-1 α	– Proteína inflamatória de macrófagos 1 alfa
MOPS	– Tampão de ácido sulfônico
MCP-1	– Proteína quimiotática monocitária 1
MMPs	– Metaloproteinases
MP	– <i>Mycoplasma pneumoniae</i>
mRNA	– Ácido ribonucleico mensageiro
MyD88	– Proteína de diferenciação mielóide 88
(NH ₄) ₂ SO ₄	– Sulfato de amônio
N/A	– Não aplicável
NF- κ B	– Fator nuclear kappa B
NIH	– <i>National Institute of Health</i>

ODDs	– Medida de intensidade de associação
p	– Coeficiente de significância
PAI-1	– Inibidor de ativação de plasminogênio 1
PAMP	– Padrão molecular associado à patógenos
pb	– Par de base
PBS	– Tampão fosfato salino
PCR	– Reação em cadeia pela polimerase
pH	– Potencial hidrogeniônico
PRRs	– Receptores que reconhecem padrões moleculares
r	– Coeficiente de correlação
RNA	– Ácido ribonucleico
RSVF	– <i>Respiratory syncytial virus fusion</i>
SMC	– Células musculares lisas
SNPs	– Polimorfismo de nucleotídeo único
SSC	– Solução de citrato e cloreto de sódio
ssRNA	– Ácido ribonucleico fita simples
TBE	– Tampão contendo Tris-base, ácido bórico e EDTA
TIR	– Receptor interleucina 1- <i>Toll</i>
TRAM	– Proteína adaptadora relacionada ao TRIF
TIRAP	– Proteína adaptadora com domínio homólogo ao TIR
TGF-β	– Fator de crescimento transformante beta
TLRs	– Receptores <i>Toll-like</i>
TNF-α	– Fator de necrose tumoral alfa
TRIF	– Proteína adaptadora com domínio TIR induzido por interferon beta
Tris-HCL	– Tris-ácido clorídrico
UNG	– Uracil n-glicosilase
UV	– Ultravioleta
VCAM-1	– Molécula de adesão vascular – 1
VLDL	– Lipoproteína de muito baixa densidade
VSMC	– Células musculares lisas vasculares

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
1.1.	Aterosclerose.....	17
1.2.	Receptores <i>Toll-Like</i> (TLRs)	23
1.3.	Agentes Infecciosos e aterosclerose.....	30
2	OBJETIVOS.....	38
2.1.	Objetivo geral.....	38
2.2.	Objetivos específicos.....	38
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	39
3.1.	Casuística.....	39
3.2.	Amostras biológicas.....	40
3.3.	Técnica de Imunohistoquímica (IHQ).....	40
3.4.	Técnica de Hibridização <i>in situ</i> (HIS).....	43
3.5.	Análise das reações de IHQ e HIS.....	45
3.6.	Extração e análise de DNA genômico.....	46
3.7.	Extração e análise de RNA total.....	48
3.8.	Análise da expressão de mRNA pela PCR em Tempo Real.....	49
3.9.	Pesquisa quantitativa dos agentes infecciosos pela PCR em Tempo Real.....	52
3.10.	Controle de qualidade da PCR	55
4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	59
5	RESULTADOS.....	60
5.1.	Imunohistoquímica	60
5.2.	Hibridização <i>in situ</i>	71
5.3.	Inflamação e gordura	83
5.4.	IHQ x HIS	84
5.5.	Biologia Molecular	87
5.5.1.	Estudo da expressão de mRNA dos receptores <i>Toll-like</i>	87
5.5.2.	Estudo dos agentes infecciosos pela PCR em Tempo Real	91
6	DISCUSSÃO.....	94
6.1.	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	95

6.2.	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	100
6.3.	Co-infecção <i>C. pneumoniae</i> e <i>M. pneumoniae</i>	105
6.4.	Receptores <i>Toll-like</i>	106
7	RESUMO GERAL	116
8	CONCLUSÕES	119
	REFERÊNCIAS	120
	ANEXOS	130

1 INTRODUÇÃO

1.1. Aterosclerose

A palavra aterosclerose deriva do grego *atero*, que significa caldo ou pasta, e *esclerose*, que corresponde a endurecimento. A aterosclerose é uma doença multifatorial, lenta e progressiva, resultante de uma série de respostas celulares e moleculares altamente específicas (GOTTLIEB; BONARDI; MORIGUCHI, 2005).

Doença aterosclerótica é a maior causa de morbidade do hemisfério ocidental. As manifestações clínicas da aterosclerose variam de doença arterial coronariana (DAC) à doença cerebrovascular. Fatores de risco convencionais que incluem o tabagismo, hipertensão e altas concentrações de lipídeos no soro, não explicam completamente a incidência, prevalência e distribuição das doenças cardiovasculares (DCV). A hipótese de que a inflamação contribui para a patogenicidade da aterosclerose data mais de 100 anos, conforme Virchow em 1859 e Osler em 1908. Estudos recentes demonstram que vários marcadores de inflamação sistêmica podem prever futuros eventos cardiovasculares (BOMAN; HAMMERSCHLAG, 2002).

No ano 2000, as doenças cardiovasculares foram responsáveis pela principal alocação de recursos públicos em hospitalizações no Brasil (cerca de 821 milhões de dólares) sendo a terceira causa de permanência hospitalar prolongada. Registrou-se um aumento de 176% naqueles gastos, entre os anos de 1991 e 2000. Necessita-se, então, priorizar a prevenção primária, mas na medicina atual há um enfoque para prevenção secundária ou terciária (SOUZA; CASTRO; CERRI, 2005).

Gottlieb, Bonardi e Moriguchi (2005) descrevem duas fases interdependentes na evolução da doença aterosclerótica:

- A fase “aterosclerótica” predomina a formação anatômica da lesão aterosclerótica sob a influência dos “fatores de risco aterogênicos” clássicos e que leva décadas para evoluir. Devido à sua história lenta e gradual, sua evolução geralmente não traz consigo manifestações clínicas dramáticas;
- A fase trombótica, a influência dos “fatores de risco trombogênicos” determina a formação aguda de trombo sobre a placa aterosclerótica, fenômeno este diretamente ligado aos eventos agudos coronarianos como infarto do miocárdio, angina instável e morte súbita.

Na patogenia da aterosclerose, um conjunto de fatores de risco clássicos e emergentes tem sido correlacionado (Quadro 1). Contudo, as lipoproteínas, principalmente as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) têm ocupado um papel de destaque na etiologia da doença aterosclerótica, ainda que, muitos indivíduos desenvolvem doença cardiovascular na ausência de anormalidades no perfil das lipoproteínas (GOTTLIEB; BONARDI; MORIGUCHI, 2005).

Marcadores Inflamatórios	Marcadores Hemostáticos / Trombóticos	Fatores Plaquetários	Fatores Lipídicos	Outros fatores
Proteína C-reativa	Fibrinogênio	Agregação Plaquetária	Lp(a)	Homocisteína
Interleucinas	Fator von Willebrand	Atividade Plaquetária	ApoA e B	Lipase A2
Moléculas de Adesão	Pró-trombina fragmento 1 + 2	Tamanho e volume de Plaquetas	LDL-ox	Microalbuminúria ECA
CD40	Fatores V, VII e VIII			Polimorfismo ApoE
Amilóide A sérica	Dímero D Fibrinopeptídeo A PAI-1 Ativador de Plasminogênio Tecdual			Agentes Infecciosos

Quadro 1 – Marcadores e fatores envolvidos na aterogênese. Retirado de Gottlieb, Bonardi e Moriguchi (2005)

A primeira mudança observável nos vasos arteriais, em uma dieta rica em colesterol, é o acúmulo de lipoproteínas na camada íntima das artérias. Posteriormente, monócitos aderem à superfície do endotélio, migram para a porção íntima do endotélio, englobam lipoproteínas e diferenciam-se, formando as células espumosas (foam cells), as quais com o tempo entram em apoptose, contribuindo para aumentar a necrose da lesão. A lesão cresce em direção a porção adventícia até alcançar um ponto crítico, depois começa a expandir para o lúmen. O crescimento ocorre com a migração de novas células mononucleares do sangue. Ocorre proliferação celular, produção de matriz extracelular e acúmulo de lipídeos extracelulares (LUSIS, 2000).

A inflamação participa da aterosclerose no seu início, desenvolvimento, até seu ponto crítico: as complicações trombóticas (Figura 1). Normalmente, as células endoteliais (CE) resistem à adesão dos leucócitos na membrana celular, porém os fatores de risco para aterosclerose (uma dieta rica em gordura saturada, cigarro, hipertensão, hiperglicemia, obesidade ou resistência à insulina) podem iniciar a expressão de moléculas de adesão pelas células endoteliais (LIBBY, 2006).

Figura 1 – Participação da inflamação em todos os estágios da aterosclerose. A) Recrutamento de leucócitos. B) Formação das células espumosas e entrada de linfócitos T. C) Ruptura da placa fibrótica e formação de trombo. Retirado de Libby (2006)

As moléculas de adesão têm emergido como particulares candidatas para adesão precoce de leucócitos no endotélio arterial em sítios de ateromas iniciais. Entre as principais moléculas de adesão, destacam-se a molécula de adesão vascular (VCAM-1), a molécula de adesão intercelular (ICAM-1), a E-selectina, também denominada de molécula de adesão de fase aguda ou entre endotélio e leucócitos, entre outras. Acredita-se que a secreção destas moléculas é regulada por citocinas sintetizadas em pequenas concentrações pelo endotélio arterial. Destas salientam-se IL-1, IL-4, o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a gama interferon (IFN- γ). Na vigência de disfunção endotelial, a concentração destas citocinas eleva-se, estimulando a produção de moléculas de adesão, assim favorecendo o recrutamento e adesão de monócitos à superfície endotelial (GOTTLIEB; BONARDI; MORIGUCHI, 2005).

De acordo com Lusis (2000), o endotélio vascular funciona como uma barreira permeável seletiva entre o sangue e os tecidos do organismo. Regula a trombose, a inflamação, o tônus e o remodelamento vascular. Os locais de predileção da lesão aterosclerótica são determinados, em parte, pelas forças hemodinâmicas que agem nas células endoteliais.

O fluxo sanguíneo produz "estresse" nos vasos, o qual induz à produção de mecanismos anti-aterogênicos na parede arterial, tais como, aumento da expressão de enzimas antioxidantes, a superóxido dismutase ou óxido nítrico sintase. A vasodilatação decorrente da liberação do óxido nítrico limita a expressão do VCAM-1 por inibir a ativação do fator nuclear-kappa B (NF- κ B), um regulador-mestre da inflamação, deste modo inibe também a agregação plaquetária. Contudo, nas áreas onde o fluxo sanguíneo é dificultado, esses mecanismos anti-aterogênicos são diminuídos (LIBBY, 2006).

Recentes estudos histopatológicos em jovens adultos que morreram de causas traumáticas (não-cardiovascular) demonstraram infiltração e deposição de lipídeos na sub-íntima, formando uma lesão pré-aterosclerótica denominada estria gordurosa. Esta é caracterizada por um centro lipídico, com uma camada fibrosa densa (capa fibrótica), a qual progressivamente alarga, reduzindo o diâmetro do vaso e consequentemente interrompendo o fluxo sanguíneo. Embora, a infiltração lipídica precoce sugere uma subsequente progressão para o ateroma, o mecanismo que lidera o primeiro estágio para o próximo, ainda não foi definido (LOSCALZO, 2005).

Na propagação da aterosclerose, células inflamatórias (linfócitos T e monócitos) são recrutadas, induzidas pela expressão de fatores quimiotáticos como a interleucina 8 (IL-8), o IFN- γ e a proteína quimiotática de macrófago 1 (MCP-1). As células musculares lisas (VSMC) migram da média para a íntima induzidas pela estimulação do fator de transformação beta (TGF- β). As células musculares lisas produzem colágeno, o qual forma uma capa fibrótica na lesão madura, e o interior da lesão é rico em células espumosas e em éster de colesterol (LOSCALZO, 2005).

A inflamação interfere com a integridade da matriz de colágeno de dois modos: pelo bloqueio da formação de novas fibras colágenas e por estimular a destruição do colágeno já existente. O IFN- γ , produzido pelos linfócitos T na placa, impede a produção de colágeno inibindo a interleucina 1 (IL-1) e o TGF- β , estes iriam estimular as produtoras de colágeno, as VSMC. Também, os linfócitos T, participantes ativos da inflamação, produzem enzimas que degradam o colágeno, são as metaloproteinases (MMPs). Outras causas da destruição do colágeno são possíveis, entretanto estas parecem ser as mais comuns. Assim, a inflamação promove o início da lesão aterosclerótica, sua progressão para placa de ateroma,

mas também enfraquece a capa fibrótica, a qual tende a se romper, e finalmente, incentiva a trombogenicidade do centro lipídico (LIBBY, 2006).

O desenvolvimento da trombose, principal causa de eventos coronários agudos, depende principalmente da composição e vulnerabilidade da placa, mais do que da severidade da estenose. As placas vulneráveis ou instáveis, geralmente, possuem uma capa fibrótica bem delgada e grande número de células inflamatórias, mais do que as placas estáveis (ricas em cálcio) (LUSIS, 2000).

Embora qualquer artéria possa ser afetada, os principais alvos da doença são a aorta, as artérias coronárias e cerebrais, tendo como principais consequências o infarto do miocárdio, a isquemia cerebral e o aneurisma aórtico (GOTTLIEB; BONARDI; MORIGUCHI, 2005).

O termo aneurisma aórtico refere-se a uma dilatação patológica do lúmen da aorta, com diâmetro 1,5 vezes maior do que o normal, o qual envolve um ou mais segmentos. Pesquisas recentes sobre as doenças da aorta investigam fatores genéticos e ambientais associados no desenvolvimento dos aneurismas aórticos (WASSEF et al., 2007).

A aterosclerose é a maior das causas da etiologia dos aneurismas, através da destruição da túnica média secundária a placa de ateroma, a qual se origina na túnica íntima. Aneurismas ateroscleróticos ocorrem com maior frequência na aorta abdominal, porém artérias ilíacas, o arco aórtico e partes descendentes da aorta torácica podem estar envolvidos (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

Baman et al. (2004) mostraram que a taxa de mortalidade é 56% maior em pacientes que possuem aneurismas associados à aterosclerose do que em pacientes que possuíam apenas doença aterosclerótica.

Nichols; Lagana e Parwani (2008) concluíram que os aneurismas das artérias coronárias estão, usualmente, associados à aterosclerose, sendo esta uma de suas causas mais comum, assim como a vasculite auto-imune. A aterosclerose sobrepõe-se à doença de Kawasaki em crianças. Em outros casos, a aterosclerose pode causar aneurismas apenas em pacientes que possuem polimorfismos que atingem o remodelamento vascular, produzindo excesso de atividade do TGF- β , disfunção do TGF- β e hiperatividade das metaloproteinases. A doença aterosclerótica é uma doença universal das artérias coronárias de adultos, mas apenas 1,5% destes formam aneurismas, talvez sejam geneticamente suscetíveis.

1.2. Receptores *Toll-Like* (TLRs)

Como foi anteriormente explanado, há uma invasão de macrófagos e linfócitos T dentro das placas ateroscleróticas, as quais sugerem que ambos os sistemas imunológicos (inato e adquirido) estão envolvidos na formação da aterosclerose. Considerando que a imunidade adquirida é induzida pela imunidade inata, faz-se necessário esclarecer o mecanismo de ativação da imunidade inata na patogênese da aterosclerose (ASHIDA et al., 2005).

O sistema imune inato é altamente desenvolvido, uma de suas habilidades é discriminar entre antígenos próprios e estranhos, um processo que requer, em grande extensão, uma família evolucionária preservada de proteínas, os Receptores *Toll-like* (TLRs) (ANDERS; BANAS; SCHLONDORFF, 2004).

Em 1997, Medzhitov e Janeway Jr. da Universidade de Yale descobriram a *Toll* humana, que antes já tinha sido identificada a primeira proteína *Toll*, só que em moscas *Drosophilas* por Nusslein-Volhard na Alemanha. A proteína *Toll* e o receptor de interleucina 1 (IL-1) são semelhantes em suas partes internas, mas suas extremidades são completamente diferentes, desta maneira foi que esses pesquisadores descobriram a primeira *Toll* humana, posteriormente denominada de Receptor *Toll-Like 4* (TLR4) (O'NEILL, 2005).

Esses receptores possuem um papel preponderante na iniciação das imunidades inata e adquirida. Em mamíferos, a família dos Receptores *Toll-like* age como um sensor primário de componentes microbianos conservados, direcionando a indução da resposta biológica específica (ZHU et al., 2000).

A imunidade inata funciona como sensor e erradicador de patógenos, estabelecendo a imunidade adquirida, para tanto, necessita de receptores que reconhecem padrões moleculares (PRRs). Entre estes os TLRs, um grupo de proteínas transmembranares, detêm a habilidade de ativar células apresentadoras de antígenos (APCs). Em humanos, incluem-se 10 TLRs (1-10) e em camundongos foram descobertos 12 TLRs (1-9 e 11-13) (KAISHO; AKIRA, 2006).

Os TLRs 1, 2, 4, 5 e 6 são expressos na superfície das células, nas quais se especializam no reconhecimento de produtos bacterianos, incluindo lipoproteínas bacterianas e o ácido lipoteicóico (LTA). Os TLRs 3, 7, 8 e 9 estão localizados nos compartimentos intracelulares, são especializados na detecção de vírus ou no reconhecimento de ácidos nucleicos virais, incluindo DNA dupla-fita (TLR3), RNA viral (TLR7 e 8) ou DNA de bactérias e vírus não-metilados (TLR9) (PARKER et al., 2005). O TLR 10 é preferencialmente expresso em tecidos e células envolvidas na resposta imunológica. É altamente expresso em tecidos linfóides: baço, timo e

tonsilas (CHUANG; ULEVITCH, 2001).

Vários ligantes dessa família foram identificados, como sendo componentes moleculares de microorganismos e funcionam como adjuvantes imunológicos, pertencendo à categoria dos lipídeos, proteínas ou ácidos nucleicos (Figura 2) (KAISHO; AKIRA, 2006). Fatores exógenos e endógenos foram sugeridos como iniciadores da inflamação aterosclerótica, e muitos destes são ligantes potenciais dos TLRs. O Lipopolissacarídeo (LPS) dos patógenos está entre os vários possíveis agonistas exógenos iniciadores da inflamação aterosclerótica, sendo pró-aterogênico e foi constatado que a mutação no gene do TLR4, do qual ele é ligante, diminui tal lesão (STOOL; DENNING; WEINTRAUB, 2004; WIEDERMANN et al., 1999; COOK; PISETSKY; SCHWARTZ, 2004 apud TOBIAS; CURTISS, 2005).

Figura 2 – Ligantes dos TLRs. Abreviações: dsRNA, RNA dupla-fita; LPS, lipopolissacarídeo; GIPLs, glicolipídeos; PAMP, padrão molecular associado à patógenos; RSVF, *respiratory syncytial virus fusion*; ssRNA, RNA fita simples; TLR, Toll-like receptor. Retirado de West, Koblansky e Ghosh (2006).

O TLR2 é essencial a uma variedade de ligantes. Por exemplo, o TLR2 responde a peptideoglicana (um componente primordial das bactérias gram-positivas), aos lipopeptídeos e as lipoproteínas de agentes infecciosos. Também coopera com outros membros da família TLR, em particular, com TLR1 e TLR6, contribuindo para a discriminação entre os diferentes componentes microbianos. Células necrosadas, mas não células apoptóticas, ativam fibroblastos e macrófagos, via TLR2 (ANDERS; BANAS; SCHLONDORFF, 2004).

Quando os TLRs nos macrófagos são ativados, eles lideram a ativação do NF- κ B, o qual ocasiona a produção de citocinas pró-inflamatórias e a expressão de moléculas co-estimulatórias, resultando na indução da imunidade adquirida. Exames histopatológicos de placas ateroscleróticas humanas mostram que o TLR4 é um receptor de lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias gram-negativas e o TLR2, um receptor para peptideoglicanas de bactérias gram-positivas, ambos expressos nos macrófagos, que invadem as placas de ateroma. Neste caso, a imunorreatividade desses receptores é localizada com a translocação do NF- κ B, um marcador de ativação dessa cascata, sugerindo que os TLRs apresentam um importante papel na ativação de macrófagos em tais placas (ASHIDA et al., 2005).

Quando os TLRs são estimulados, recrutam moléculas adaptadoras ativando uma cascata de sinalização "downstream". As quatro maiores moléculas adaptadoras descobertas, até agora, são: a proteína 88 de diferenciação mielóide (MyD88); *MyD88 adaptor-like* (Mal), conjuntamente com a proteína adaptadora contendo domínio homólogo ao *Toll/IL-1 Receptor* (TIR) (TIRAP); adaptador contendo domínio TIR induzido por interferon beta (TRIF) e molécula adaptadora relacionada ao TRIF (TRAM). A ativação do TLR4 recruta todas as quatro adaptadoras, enquanto o TLR3 é dependente da TRIF e o TLR2 requer a MyD88 e a

a defesa contra patógenos estranhos e ligantes endógenos inflamatórios. O TLR4 é modulado por LDL oxidada e moléculas endógenas, por exemplo: a LDL minimamente modificada, proteínas de choque térmico e pelo domínio extra A (EDA) da fibronectina, servindo como "gatilho" na cascata de ativação do NF- κ B e em outros fatores transcrpcionais da aterogênese, os quais induzem a expressão de genes pró-inflamatórios (MICHELSEN et al., 2004).

Limitações inerentes a estudos em humanos não permitem análises experimentais celulares diretas, necessárias na aterosclerose, porém é provável que ambos os mecanismos das imunidades, inata e adquirida, contribuem para a formação e progressão das lesões ateroscleróticas (COOK; PISETSKY; SCHWARTZ, 2004).

Sabe-se que a ativação exagerada ou por tempo prolongado dos TLRs desenvolve uma inflamação sistêmica severa, incluindo choque séptico com alta mortalidade. Além disso, conjectura-se uma relação entre os TLRs e várias doenças inflamatórias crônicas. (Tabela 1) (LEE; HWANG, 2006).

A descoberta dos TLRs gerou muitas expectativas, sem precedentes. Os pesquisadores esperam encontrar explicações para muitos aspectos ainda desconhecidos da imunidade e da infecção. O estudo desses receptores já está começando a revelar alvos para medicamentos que poderão aumentar a atividade protetora do organismo, aperfeiçoar vacinas e tratar muitas doenças potencialmente mortais. (O'NEILL, 2005).

Tabela 1 – Evidências experimentais sugerindo o envolvimento dos TLRs em doenças crônicas inflamatórias. Retirado de Lee e Hwang (2006)

Tipos de estudo	TLRs envolvidos	Doenças	Características
Polimorfismos	TLR4 Asp299Gli	Doença de Alzheimer (MINOTTI et al., 2006) Diabetes (KOLEK et al., 2004) Doença arterial coronariana (KOLEK et al., 2004) Aterosclerose (KIECHL et al., 2002)	O Polimorfismo nos genes está associado com a proteção do desenvolvimento de doenças
	Sequência variante TLR4	Câncer de próstata (CHEN et al., 2005; ZHENG et al., 2004)	
	Múltiplos SNPs nos TLRs 6-1-10 cluster	Câncer de Próstata (SUN et al., 2005)	
	Stop codon TLR5	Lúpus eritematoso sistêmico (HAWN et al., 2005)	
	TLR4 Asp299Gli	Colite ulcerativa/Doença de Crohn (FRANCHIMONT et al., 2004)	
Camundongos <i>Knockout</i>	TLR4 Treo399Leu	Colite ulcerativa (TOROK et al., 2004)	A maioria dos pacientes apresentava mutação
	TLR2 Arg753Gln	Aterosclerose (HAMMAN et al., 2005)	
	TLR4	Aterosclerose (MICHELSEN et al., 2004)	
	TLR2	Aterosclerose (MULLICK et al., 2005) Isquemia renal (LEEMANS et al., 2005)	
	TLR2	Isquemia renal (LEEMANS et al., 2005)	
Modelo de doença experimental	TLR3	Diabetes (WEN et al., 2004)	O tratamento com agonista de TLR em animais induziu doença experimental
	TLR2/TLR3/TLR9	Artrite (DENG et al., 1999; LIU et al., 2001; ZARE et al., 2004)	
Infecção	TLR2/TLR4	Aterosclerose (<i>Chlamydia pneumoniae</i>) (NETEA et al., 2002)	<i>C. pneumoniae</i> é agonista do TLR2
		Câncer gástrico (<i>Helicobacter pylori</i>) (GOBERT et al., 2004; MANDELL et al., 2004)	<i>H. pylori</i> é agonista do TLR2 e TLR4
Expressão do TLR	TLR2	Artrite reumatóide (SEIBL et al., 2003)	A expressão do TLR foi aumentada em tecidos de pacientes doentes
	TLR4	Isquemia cardíaca (FRANTZ et al., 1999) Doença inflamatória do intestino (CARIO; PODOLSKY, 2000)	
	TLR1/TLR2/TLR4	Aterosclerose (EDFELDT et al., 2002)	

1.3. Agentes Infecciosos e aterosclerose

As infecções representam o possível vínculo entre a doença arterial coronariana e os bem reconhecidos riscos associados com marcadores inflamatórios circulantes, tais como a proteína C reativa (CRP), fibrinogênio, amiloide sérico e interleucina-6 (FONG et al., 2003).

As evidências em humanos sugerem que a infecção predispõe à aterosclerose, baseada em estudos nos quais os agentes infecciosos residem na parede dos vasos ateroscleróticos e em estudos soro-epidemiológicos que associaram o anticorpo Imunoglobulina G (IgG) e a aterosclerose (EPSTEIN et al., 1999; ESPINOLA-KLEIN et al., 2002; LIU et al., 2000; SCANNAPIECO, 1999 apud LOSCALZO, 2005).

A aterogênese poderia ser iniciada por um agente infeccioso através da lesão do endotélio vascular, diretamente por invasão da íntima do vaso, ou indiretamente através da liberação de LPS sistematicamente, com subsequente ativação de citocinas pró-inflamatórias. Os microorganismos também poderiam levar a aceleração da aterosclerose em qualquer estágio por aumento do recrutamento de células inflamatórias (macrófagos, linfócitos T) às lesões pré-existentes, como também, poderiam ser levados às lesões ateroscleróticas precoces por monócitos, macrófagos ou linfócitos. Estes estimulam a produção de moléculas de adesão e citocinas pró-inflamatórias, eventualmente, levando a progressão da lesão por aumento do acúmulo na íntima dos macrófagos e proliferação das células do músculo liso, todos componentes críticos no desenvolvimento da aterosclerose (FONG et al., 2003).

Indiretamente, as infecções crônicas poderiam resultar em alterações nos perfis lipídicos sanguíneos através da liberação de citocina sistêmica, levando a um ambiente mais pró-aterogênico. As infecções podem resultar na diminuição ou incapacidade funcional da lipoproteína de alta densidade (HDL), a qual é anti-aterogênica, como também, em um aumento nos triglicerídeos e lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), os quais são pró-aterogênicos (Figura 4) (FONG et al., 2003).

Figura 4 – Potenciais mecanismos das infecções no desenvolvimento da aterosclerose. Retirado de Fong et al. (2003)

Teoricamente, as infecções podem potencializar a precipitação aguda de eventos isquêmicos nos estágios finais do desenvolvimento aterosclerótico. Isto poderia ocorrer devido à produção de metaloproteinases e por gerar um ambiente pró-coagulante, pois quando ativa as citocinas inflamatórias aumenta a produção de

plaquetas, fibrinogênio e fator tissular, desregulando para menos o sistema fibrinolítico (FONG et al., 2003).

Muitas evidências associadas e correlatas existem sobre o envolvimento da infecção pela *Chlamydia pneumoniae* em alguns aspectos da aceleração de doenças cardiovasculares. Este é um patógeno procarioto intracelular, o qual pode infectar e sobreviver em uma variedade ampla de células hospedeiras, incluindo epitélio pulmonar, macrófagos, monócitos, células musculares lisas e endotélio vascular. Foi demonstrado que *C. pneumoniae* é capaz de iniciar e propagar a inflamação em meios que contribuem para aterosclerose (BELLAND et al., 2004).

C. pneumoniae pode infectar e modificar a fisiologia de várias células típicas presentes na circulação e devem transitar do pulmão para o ateroma via monócitos circulantes (HARANAGA et al., 2001). Células infectadas, subsequentemente, possuem uma expressão de moléculas de adesão desregulada e produzem citocinas inflamatórias (DUNNE, 2000). *C. pneumoniae*, intacta ou seu LPS, podem aumentar a captura da lipoproteína de baixa densidade (LDL) nos macrófagos humanos, para se tornarem células espumosas de éster de colesterol *in vitro*, um componente – chave no início da aterogênese. Além do mais, a proteína de choque térmico 60 clamidial (CHSP-60) pode realçar a oxidação intracelular da LDL, sua forma tóxica, que é considerada como mediador primário da aterogênese (FONG et al., 2003).

Muitos estudos detectaram *C. pneumoniae* em placas ateroscleróticas por Hibridização *in situ* (HIGUCHI, 2000); por reação em cadeia da polimerase (PCR) conforme Blasi, Deti e Erba (1996), Farsak et al. (2000) e Apfalter (2001, 2003). Como também em PCR em tempo real (TONDELLA et al., 2002).

No estudo de Guech-Ongey et al. (2006), os pesquisadores não descartaram a possibilidade da *C. pneumoniae* aumentar o risco de eventos secundários cardiovasculares em pacientes que já possuíam doenças cardíacas. A associação entre *C. pneumoniae* e doença arterial (coronária, carotídea e periférica) foi descrita em: estudos soro-epidemiológicos (SAIKKU et al., 1988, apud COUTINHO; NAKAMAE; MENEZES, 2000; CLANCY et al., 2006); anátomo-patológicos (KUO et al., 1997 apud COUTINHO; NAKAMAE; MENEZES, 2000); e experimentais (MOAZED et al., 1999 apud COUTINHO; NAKAMAE; MENEZES, 2000) (Tabela 2).

Tabela 2 – Associação da *C. pneumoniae* com a aterosclerose

Sumário de Evidências		
A. Estudos Epidemiológicos	ODDs Ratio Médio	Referências
Caso-controle / Transversal	2.0	DANESH et al., 1997; BLOEMENKAMP et al., 2003
Prospectivo / Longitudinal	1.1 – 1.5	DANESH et al., 2000; BLOEMENKAMP et al., 2003
B. Estudos Patológicos	24. 5	FONG, 2003
C. Mecanismos Biológicos	N/A	
- Podem infectar células endoteliais vasculares humanas, macrófagos, SMC		GAYDOS et al., 1996
- Estimula a adesão molecular e de citocinas em células endoteliais humanas <i>in vitro</i>		KAUKORANTA-TOLVANEN et al., 1996
- O LPS de <i>C. pneumoniae</i> estimula a apreensão de LDL em macrófagos		KALAYOGLU; BYRNE, 1998
- CHSP-60 realça a oxidação intracelular do LDL		KALAYOGLU et al., 1999
- CHSP-60 desregula o TNF- α e as metaloproteinases		KOL et al., 1998
- Induz o fator tissular nas células vasculares		DECHEND et al., 1999
D. Modelos Animais		
- Causa disfunção endotelial em camundongos ApoE -/-		LIUBA et al., 2000
- Causa lesão aterosclerótica precoce (p.ex.: camada gordurosa) em coelhos		FONG et al., 1999
- Causa proliferação na íntima em artérias coronárias de porcos		PISLARU et al., 2003
- Acelera lesões hiperlipidêmicas em coelhos e camundongos		MUHLESTEIN et al., 1998; MOAZED et al., 1999; HU ;PIERCE ; ZHANG, 1999
E. Experimentos Clínicos		
- Eventos cardiovasculares em pequenos experimentos		GUPTA et al., 1997; GURFINKEL et al., 1997; STONE et al., 2001
- Marcadores inflamatórios, porém não eventos cardiovasculares		MUHLESTEIN et al. 2000
- Os macrolídeos falharam na redução de eventos vasculares em experimentos extensos		CERCEK, 2002; DUNNE et al., 2002

Abreviações: ApoE -/-, apolipoproteína-deficiente; CHSP-60, proteína clamidial de choque ao calor (60kd); LDL, lipoproteína de baixa densidade; LPS, lipopolissacarídeo (endotoxina); N/A, não aplicável; SMC, células musculares lisas; TNF, fator de necrose tumoral. Retirado de Fong et al. (2003).

De acordo com Cao et al. (2007) tanto a *C. pneumoniae* quanto o TLR2 e TLR4 promovem a formação de células espumosas, um marcador do início da aterosclerose, na presença da LDL.

O outro agente infeccioso analisado neste estudo é o *Mycoplasma pneumoniae*, fazendo parte do grupo dos Micoplasmas, que é um grupo dos menores e mais simples procariotos auto-replicantes. Estes organismos são diferentes de outras eubactérias, em muitos aspectos, tais como pela ausência da membrana celular e por apresentarem um genoma bem reduzido. Muitos micoplasmas não são patogênicos, embora existam espécies patogênicas para humanos e animais, instaurando uma variedade de doenças, incluindo doenças respiratórias agudas, infecções nas articulações e do trato geniturinário, doenças auto-imunes e agem como possíveis co-fatores na patogênese da AIDS (YOU et al., 2006).

A infecção por *M. pneumoniae* ocorre no trato respiratório inferior e superior, em crianças e adultos, em todas as partes do mundo. O clima e área geográfica não têm muita significância. É transmitida por aerossóis de pessoa para pessoa (WAITERS; TALKINGTON, 2004).

Foi observado que em células epiteliais do trato respiratório o *M. pneumoniae*, para facilitar sua internalização na célula hospedeira, libera peróxido de hidrogênio e radicais superóxido, que agem concomitantemente com as moléculas oxigenadas tóxicas endógenas induzindo um estresse oxidativo no epitélio do hospedeiro (TRYON; BASEMAN, 1992 apud WAITERS; TALKINGTON, 2004). Sabe-se que uma das causas para disfunção endotelial nas artérias é o estresse oxidativo.

Os micoplasmas possuem lipoproteínas fixas na porção exterior da membrana plasmática, denominadas de lipídeos associados a proteínas de membranas (LAMPS), estas são altamente antigênicas e poderiam variar de tamanho e fases. Atualmente, as LAMPS atraíram atenção pela abundância nos

micoplasmas ao contrário de outras eubactérias (YOU et al., 2006). Estas proteínas antigênicas induzem a liberação de citocinas inflamatórias, tais como IL-1 β , IL-6, TNF- β e quimiocinas como IL-8, proteína quimiotática monocitária (MCP-1), proteína inflamatória de macrófagos 1 alfa (MIP-1 α), fatores estimulantes de colônia de monócito-granulócito (GM-CSFs), como também prostaglandinas e óxido nítrico. Especula-se que a injúria nas células hospedeiras não consiste de uma lesão direta, mas sim devido a sua própria imunopatogênese (RAZIN et al., 1998 apud YOU et al., 2006).

M. pneumoniae é um patógeno respiratório comum. Exibe comportamento epidemiológico e suscetibilidade a antibióticos similares ao da *C. pneumoniae*, mas uma característica marcante é a necessidade de colesterol para a sua sobrevivência. Este microorganismo já foi detectado nos centros lipídicos das placas coronárias, juntamente com *C. pneumoniae* (HIGUCHI; RAMIRES, 2002).

Com relação à soropositividade do *M. pneumoniae*, Horne et al. (2002) mencionou que foi mais prevalente em pacientes com doenças cardiovasculares do que em controles.

O *M. pneumoniae* foi observado em quatro grupos de artérias coronárias, a saber: placas rotas trombóticas, placas não rotas, placas não rotas de pacientes que tiveram infarto agudo do miocárdio e segmentos coronarianos arteriais de pacientes com cardiomiopatia dilatada ou com doença de Chagas. Encontrava-se na íntima de quase todas as amostras estudadas e principalmente em áreas gordurosas. Pela Microscopia Eletrônica, detectou-se a presença de *M. pneumoniae* nos espaços intercelulares endoteliais e dentro das placas trombóticas. Observou-se uma associação com *C. pneumoniae*, ambas bactérias estavam em espaços extracelulares como também em CE e macrófagos (HIGUCHI et al., 2003).

Momiyama et al. (2004) mostraram que a soropositividade a *M. pneumoniae* estava associada a doenças arteriais coronarianas, contudo esta associação era reduzida em pacientes com somente soro positividade a *C. pneumoniae*, desse modo sugeriu que a co-infecção (*M. pneumoniae* e *C. pneumoniae*) poderia ser um cofator importante para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

Higuchi-Dos-Santos et al. (2005) demonstraram que os nódulos de calcificação presentes na estenose de válvulas aórticas continham *C. pneumoniae* e *M. pneumoniae*, sugerindo que tanto o processo da estenose em válvulas aórticas, quanto o processo da aterosclerose apresentam agentes infecciosos envolvidos no desenvolvimento da calcificação e inflamação dos mesmos.

As LAMPS dos micoplasmas são reconhecidas pelo sistema imune inato do hospedeiro através dos TLRs 2 e 6, este último como forma heterodímera daquele, servindo como co-receptor no reconhecimento. Ainda não se sabe, ao certo, como os TLRs reconhecem tais proteínas antigênicas, presumi-se que pode estar unido às regiões ricas em leucina do TLR2 (FUJITA et al., 2003).

O presente trabalho tem por objetivo estudar a relação entre os receptores *Toll-like*, TLR2 e TLR4, com a presença de *Chlamydia pneumoniae* e *Mycoplasma pneumoniae*, em tecidos vasculares humanos com aterosclerose leve e intensa. A intenção deste estudo será contribuir com a ampliação do conhecimento acerca dos TLRs na modulação da resposta imunológica induzida por agentes infecciosos, como também no envolvimento dos TLRs e agentes infecciosos na gênese e progressão da aterosclerose.

2 OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Analisar a expressão dos receptores *Toll-likes* 2 e 4 (TLR2 e TLR4) e sua associação com os agentes infecciosos *Chlamydia pneumoniae* e/ou *Mycoplasma pneumoniae* na doença aterosclerótica.

2.2. Objetivos específicos

- Analisar a expressão de mRNA dos genes do TLR2 e do TLR4, em fragmentos obtidos de aortas ascendentes e aneurismas de aortas torácicas ou abdominais, pela PCR em tempo real.
- Caracterizar e quantificar por Hibridização *in situ* e por Imunohistoquímica, o TLR2 e o TLR4 em fragmentos de aortas ascendentes e aneurismas de aortas torácicas ou abdominais.
- Localizar e quantificar a presença de *Chlamydia pneumoniae* e *Mycoplasma pneumoniae* por Hibridização *in situ* e Imunohistoquímica, nos fragmentos de aortas e aneurismas de aortas torácicas ou abdominais.
- Pesquisar a incidência de *C. pneumoniae* e *M. pneumoniae* nas amostras de aortas e aneurismas de aortas torácicas ou abdominais, pela PCR em tempo real.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Casuística

A casuística compreende dois grupos, a saber: Grupo 1 (G1, aterosclerose leve) composto de 13 fragmentos de aortas ascendentes de pacientes submetidos à cirurgia de revascularização do miocárdio, no período de outubro de 1999 a junho de 2002, obtidas pelo Prof. Dr. José Marcos Góis. O grupo é formado por 10 homens e 3 mulheres, com idade entre 48 e 82 anos.

Incluem-se também o Grupo 2 (G2, aterosclerose avançada) formado por 14 fragmentos de aneurismas ateroscleróticos de aorta torácica ou abdominal de pacientes submetidos à cirurgia para correção do aneurisma durante o ano de 2004, no Instituto do Coração (InCOR), do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC/FMUSP), no Serviço de Cardiologia do Prof. Dr. Noedir Stolf. O grupo é formado por 9 homens e 5 mulheres, com idade entre 48 e 78 anos.

Todas as amostras foram cedidas pela Prof^a. Dr^a. Maria de Lourdes Higuchi, do Laboratório de Anatomia Patológica do InCOR, onde foram realizadas as técnicas de Hibridização *in situ* e Imunohistoquímica.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP) aprovou este projeto com protocolo número 351, como também, a Comissão Científica do InCOR com protocolo SDS 2589/05/009. (Anexo A e B, respectivamente).

3.2. Amostras biológicas

As amostras de estudo obtidas durante as cirurgias foram colocadas em tubos esterilizados e congeladas em nitrogênio líquido. Posteriormente, foram levadas para o Laboratório de Anatomia Patológica do InCOR e divididas em duas partes iguais. Uma parte mantida congelada e armazenada em *freezer* -70°C, a outra fixada em formalina tamponada a 10% e emblocada em parafina.

Secções histológicas de 4µm foram obtidas de ambas as divisões (congeladas e parafinadas), utilizando um micrótomo *Cryostat Microtome Jung* CM 1800 (Leica Instruments, Heidelberger, Alemanha) e fixadas em lâminas silanizadas para realização do ensaio de Hibridização *in situ* e Imunohistoquímica. As amostras congeladas, depois de fixadas nas lâminas, foram mergulhadas em acetona anidra por 10 minutos, à temperatura ambiente, para melhorar sua fixação.

Para a extração de DNA e RNA, somente os blocos congelados das amostras de estudo foram seccionados (4µm) utilizando o criostato, acima mencionado. Estes fragmentos foram colocados em tubos esterilizados, não ultrapassando o peso de 25 mg de tecido. O tubo contendo amostra para extração de RNA possuía *RNAlater* (Qiagen, Colônia, Alemanha), um reagente de estabilização, que protege o padrão de expressão de RNA.

3.3. Técnica de Imunohistoquímica (IHQ)

Para a reação de imunoperoxidase utilizaram-se os seguintes anticorpos primários:

- Monoclonais anti-humanos produzidos em camundongo: TLR2 (Abcam, Massachusetts, EUA), *Chlamydia pneumoniae* (Dako, Califórnia, EUA) e *Mycoplasma pneumoniae* (Fitzgerald Industries International, Massachusetts, EUA);
- Policlonal anti-humano produzido em cabra: TLR2 (Abcam, Massachusetts, EUA);
- Policlonal anti-humano produzido em coelho: TLR4 (Abcam, Massachusetts, EUA).

O Quadro 2 abaixo descreve as diluições feitas e os clones respectivos para cada anticorpo.

Anticorpo	Diluição	Clone
TLR2 (amostras parafinadas)	1: 600	TL2. 1
TLR2 (amostras congeladas)	1: 10	policlonal
TLR4 (amostras congeladas)	1: 800	policlonal
TLR4 (amostras parafinadas)	1: 1000	policlonal
<i>C. pneumoniae</i>	1: 10	RR402
<i>M. pneumoniae</i>	1:100	M2110181

Quadro 2 – Diluições e clones dos anticorpos utilizados.

A desparafinação ocorreu da seguinte forma: em xilol (3 banhos de 10 minutos cada) e depois rehidrata-se em concentrações decrescentes de álcool etílico.

As secções congeladas foram descongeladas em tampão PBS, por aproximadamente 20 minutos antes de iniciar as reações competentes, estas não precisam de recuperação do tecido, entretanto as desparafinadas necessitam.

No caso da Imunoperoxidase realizada para o anticorpo TLR2 monoclonal, *C. pneumoniae* e *M. pneumoniae*, a recuperação foi realizada em banho de água a 95°C por 40 minutos, com Tris-EDTA (pH 9.0) e adição de Tween 20 (0,1%). Para a IHQ do anticorpo TLR4 policlonal, usou-se o instrumento Panela

de Pascal (Dako, Califórnia, EUA) em substituição ao banho de água por 2 minutos, com Tris-EDTA (pH 9.0) e Tween 20 (0,1%).

Para bloqueio da peroxidase endógena, as secções foram tratadas com peróxido de hidrogênio a 3%, por 30 minutos a temperatura ambiente. A seguir, foram incubadas em câmara úmida, com *Protein Block Serum Free* (Dako, Califórnia, EUA) por 10 minutos a 37°C, para inibir as ligações não específicas e então, incubadas com os seus respectivos anticorpos primários diluídos em albumina sérica bovina (BSA) para o anticorpo TLR2, e os demais foram diluídos com o Redutor de *Background* (Dako, Califórnia, EUA), por 18h a 4°C.

Como anticorpo de ligação, utilizou-se *Envision System Labelled Polymer-HRP* (Dako, Califórnia, EUA) por 45 minutos a 37°C, para os anticorpos *C. pneumoniae* e *M. pneumoniae*. Para os demais anticorpos utilizou-se o Kit *LSAB System-HRP* (Dako, Califórnia, EUA), de acordo com as normas do fabricante. Aplicou-se como tampão de lavagem PBS contendo Tween 20 (0,1%).

Como controle-positivo das reações de Imunoperoxidase foi utilizado fragmento de tonsila (produto de tonsilectomia) para as reações dos TLRs. Nas reações dos agentes infecciosos foram usados fragmentos de pulmão e aorta aterosclerótica para *M. pneumoniae* e *C. pneumoniae*, respectivamente. Como controle-negativo, omitiu-se o anticorpo primário para se descartarem possíveis ligações não específicas.

As lâminas submetidas às reações de Imunoperoxidase foram detectadas em uma solução cromogênica contendo 3,3'-diaminobenzidina (DAKO, Califórnia, EUA). Depois foram contracoradas com hematoxilina de Harris e com solução de Scott. Finalmente, a montagem das lâminas foi feita em lamínula com resina sintética *Entellan* (Merck, Darmstadt, Alemanha).

3.4. Técnica de Hibridização *in situ* (HIS)

As sondas utilizadas foram selecionadas baseadas na sequência do Banco de genes (*GenBank*) do *National Institute of Health* (NIH) (www.ncbi.nlm.nih.gov), para os respectivos genes do TLR2 (NM_003264.3), TLR4 (NM_138554.2) e *C. pneumoniae*, baseada no fragmento Pst1(S833995.1). Todas foram fornecidas pelo fabricante com concentração inicial de 200 ng/μL (Bioneer Corporation, Daejeon, Coréia do Sul). A sonda utilizada para análise do *M. pneumoniae* foi selecionada industrialmente, não sendo revelada sua composição, fornecida com concentração inicial de 20 μg/mL (Enzo Diagnostics, Nova Iorque, EUA) (Tabela 3).

Tabela 3 – Sequência das sondas usadas na HIS

Gene	Sequência da sonda
<i>C.pneumoniae</i>	Biotina- 5'- ACA ACG GCT AGA AAT CAA TTA TAA GAC TGA AGT TGA GCA TAT TCG TGA GGG AGA TGC AGA TTT AGA TCA TGG TGT CAT TCG CCA AGG TTA AAG TCT ACG T -3'
TLR2 antisense	Biotina- 5'-CGC TGG GGA ATG GCT TTT TCT CAA TGG GCT CCA GAA GAA TGA GAA TGG CAG CAT CAT TGT TCT CAT CAA AAA GAC GGA AAT GGG AGA AGT CCA GTT CAT - 3'-Biotina
TLR2 sense	Biotina- 5'- ATG AAC TGG ACT TCT CCC ATT TCC GTC TTT TTG ATG AGA ACA ATG ATG CTG CCA TTC TCA TTC TTC TGG AGC CCA TTG AGA AAA AAG CCA TTC CCC AGC G -3'
TLR4 antisense	Biotina-5'-ATT CGT TCA ACT TCC ACC AAG AGC TGC CTC TGG TCC TTG ATC CAT TGC AG GAA ACC TGG TGT TCA CAA GTA CAA GCA AAG TCA TTC TGA GTA AGA TTT A -3'-Biotina
TLR4 sense	Biotina- 5'- TAA ATC TTA CTC AGA ATG ACT TTG CTT GTA CTT GTG AAC ACC AGA GTT TCC TGC AAT GGA TCA AGG ACC AGA GGC AGC TCT TGG TGG AAG TTG AAC GAA T -3'

A desparafinação das secções foi realizada como descrito anteriormente. As secções congeladas foram descongeladas em tampão Tris-HCl (pH 7.6), por aproximadamente 20 minutos antes de iniciar as reações específicas, não

nessitando de recuperação do tecido.

A recuperação do tecido das secções parafinadas foi realizada em banho de água a 95°C por 40 minutos com citrato (pH 6.0), para as reacções do *M. pneumoniae* adicionou-se Tween 20 (0,1%). Para as análises de TLR2 e TLR4 ocorreu uma etapa de digestão com Proteinase K (Dako, Califórnia, EUA); diluída em tampão Tris-HCL (1: 5.000), em câmara úmida por 5 minutos em temperatura ambiente. Inibiu-se a peroxidase endógena, com peróxido de hidrogénio a 3% por 30 minutos, em temperatura ambiente. Para detecção de TLR2 e *C. pneumoniae*, nas amostras parafinadas, utilizou-se *Protein Block Serum Free* (DAKO, Califórnia, EUA), por 20 minutos a 37°C, para bloquear as ligações inespecíficas.

A desnaturação do DNA a 95°C foi realizada, apenas para detectar agentes infecciosos, colocando-se as lâminas em placa quente a seco, por 8 minutos. Logo após, as lâminas foram incubadas com suas respectivas sondas, a 60°C por no mínimo de 18 horas (*overnight*). A sonda do *M. pneumoniae* foi incubada a 37°C.

Para manter apenas os híbridos específicos pareados e retirar os produtos de reacções inespecíficas realizou-se lavagem em tampão de estringência 1X SSC, a 50°C por 10 minutos. Para a reacção de *C. pneumoniae* nas secções parafinadas, realizaram-se duas lavagens consecutivas: 0,2X SSC por 10 minutos a 50°C e 2X SSC por 10 minutos a 37°C. A amplificação do sinal foi realizada utilizando-se o Kit *Genpoint* (Dako, Califórnia, EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

A detecção da reacção foi realizada através do 3,3'-diaminobenzidina (DAKO, Califórnia, EUA), na diluição 1:50 com reagente específico, a temperatura ambiente. Contracorou-se em Hematoxilina de Harris e com solução de Scott. A

montagem das lâminas foi feita em laminula com resina sintética *Entellan* (Merck, Darmstadt, Alemanha).

No emprego da técnica de Hibridização *in situ* para detectar mRNA usa-se como controle-positivo a sequência antisense do mRNA, enquanto que a sequência sense é usada como controle-negativo. Nas reações para detectar DNA-alvo, caso da *C.pneumoniae* e *M. pneumoniae*, foram usados fragmentos de coronária e pulmão, respectivamente, como controle-positivo. Como controle-negativo, omitiu-se a sonda biotinilada para se descartarem possíveis ligações não específicas.

3.5. Análise das reações de IHQ e HIS

As reações de Imunohistoquímica e de Hibridização *in situ* foram identificadas pelo produto colorido marrom, dado pelo cromógeno, no núcleo e citoplasma das células, para as reações dos TLR2 e TLR4 e apenas no citoplasma para os agentes infecciosos.

A análise histopatológica consistiu em uma semiquantificação. Esta abordagem analisou a marcação (coloração marrom) para presença dos agentes infecciosos e para os receptores *Toll-like*, tanto na camada íntima quanto na camada adventícia, sendo que nesta camada observou-se também a inflamação e gordura presentes nas artérias de estudo. Os dados foram coletados em números de cruzes da seguinte forma: 0(ausente); 1 (discreto e focal); 2 (moderado e focal) e 3 (intenso e difuso). Todas as lâminas foram analisadas no microscópio Leica DMLB (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha), em aumento de 200X e 400X.

3.6. Extração e análise de DNA genômico

O tecido foi macerado com auxílio de pistilo e extraiu-se o DNA através do Kit *DNeasy Tissue* (Qiagen, Colônia, Alemanha), seguindo as instruções do fabricante. Uma segunda extração foi empregada nas amostras dos aneurismas aórticos através do Kit *QIAamp DNA* (Qiagen, Colônia, Alemanha), conforme manual do fabricante.

Outros três testes de extrações foram feitos usando-se a mistura dos filtrados de cada amostra processada pelo Kit *QIAamp DNA* (Qiagen, Colônia, Alemanha). O primeiro teste denominou-se Método do Fenol-clorofórmio, o segundo de Método SDS e o último Método do Triton.

➤ Método Fenol-clorofórmio

Pela extração feita através do *kit QIAamp DNA*, cada amostra teve três filtrados. Estes foram homogeneizados, transformando-se nas amostras a serem extraídas, portanto, 14 amostras de 400 µL (G2) foram obtidas a partir de um "pool" dos filtrados.

Adicionou-se 250 µL de NaCl (150mM), 250 µL de EDTA (25mM), 10 µL de proteinase K e 10 µL de SDS 10%. Cada amostra foi incubada a 37°C por 1 hora. Posteriormente, centrifugou-se a 14.000 rpm por 15 minutos. Utilizando apenas o sobrenadante, adicionou-se 250 µL de fenol/clorofórmio (pH 8.0) e centrifugou-se a 14.000 rpm por 10 minutos. Retirou-se o sobrenadante, aplicou-se 40 µL de NaCl (0.4M) e 500 µL de etanol absoluto. Homogeneizou-se, deixando em repouso por 1 hora a -20°C. Centrifugou-se por 5 min. em rotação máxima, para posterior descarte do sobrenadante. Adicionou-se 50 µL de água MiliQ, 25 µL de acetato de amônio (7.5M) e 300 µL de etanol absoluto. Centrifugou-se em rotação máxima por 5

minutos. Descartou-se o sobrenadante. Adicionou-se 1 mL de etanol 70% e centrifugou-se por 5 min. a 14.000 rpm. Descartou-se o sobrenadante, novamente, deixando em repouso para secar o "pellet", por 30 minutos. Logo após, ressuspendeu-se o "pellet" com 30 µL de TE e incubou-se a 65°C por 30 minutos. Cada amostra foi acondicionada a -20°C.

➤ **Método SDS**

A partir de 400 µL de amostra, adicionou-se 400 µL de SDS (10%). Homogeneizou-se e incubou-se por 15 minutos a 56°C. Em seguida, centrifugou-se por 10 minutos a 14.000 rpm. Apenas no sobrenadante, foi adicionado 400 µL de NaCl (0.4M), após centrifugou-se por 10 minutos a 14.000 rpm. Usando apenas o sobrenadante, adicionou-se 800 µL de álcool isopropílico absoluto, deixando em repouso por 30 minutos a -20°C. Posteriormente, centrifugou-se por 10 minutos em rotação máxima. Descartou-se o sobrenadante. Aplicou-se 1mL de etanol a 70%, centrifugando-se em seguida por 5 minutos a 14.000 rpm. Descartou-se o sobrenadante, novamente, deixando em repouso para secar o "pellet", por 30 minutos. Logo após, ressuspendeu-se o "pellet" com 30 µL de TE e incubou-se a 65°C por 30 minutos. Cada amostra foi acondicionada a -20°C.

➤ **Método Triton**

A partir de 400 µL de amostra, adicionou-se 400 µL de Triton X-100 (10%). Homogeneizou-se e incubou-se por 15 minutos a 56°C. Em seguida, centrifugou-se por 10 minutos a 14.000 rpm. Apenas no sobrenadante, foi adicionado 400 µL de NaCl (0.4M), após centrifugou-se por 10 minutos a 14.000 rpm. Usando apenas o sobrenadante, adicionou-se 800 µL de álcool isopropílico absoluto, deixando em repouso por 30 minutos a -20°C. Posteriormente, centrifugou-se por 10 minutos em rotação máxima. Descartou-se o sobrenadante. Aplicou-se

1mL de etanol a 70%, centrifugando-se em seguida por 5 minutos a 14.000 rpm. Descartou-se o sobrenadante, novamente, deixando em repouso para secar o "pellet", por 30 minutos. Logo após, ressuspendeu-se o "pellet" com 30 µL de TE e incubou-se a 65°C por 30 minutos. Cada amostra foi acondicionada a -20°C.

A integridade das amostras de DNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 0,8% utilizando tampão TBE 0,5X [Tris-HCl a 45 mM, ácido bórico a 45 mM e EDTA a 1mM (pH 8,0)] (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). A separação eletroforética foi realizada a 100V, 60mA por 30 minutos, em cuba de eletroforese horizontal (Gibco BRL, Life Technologies Inc. Gaithersburg, Maryland, EUA) e fonte modelo EPS 200 (GE Healthcare, Amersham Biosciences do Brasil, São Paulo, Brasil). Como referência foi utilizado um marcador de DNA de 100 pb (Invitrogen Corporation, Califórnia, EUA).

Os fragmentos separados por eletroforese foram visualizados sob luz UV, após coloração do gel com brometo de etídio (0,5 mg/mL) (SAMBROOK; RUSSEL, 2001) e fotodocumentadas em sistema de captura de imagem Chemilmager™ 4400 (v5.5) (Alpha Innotech Corporation, Califórnia, EUA).

O DNA foi quantificado por espectrofotometria em 260 nm utilizando Nanodrop D-1000 (Nanodrop Technologies, Delaware, EUA) e a pureza do DNA determinada pela relação A_{260}/A_{280} (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

3.7. Extração e análise de RNA total

O RNA total foi extraído dos tecidos estudados utilizando-se o Kit *RNeasy Tissue* (Qiagen, Colônia, Alemanha), de acordo com o manual de instrução do

fabricante. O RNA foi quantificado por espectrofotometria no ultravioleta (UV) utilizando-se o aparelho Nanodrop D-1000 (Nanodrop Technologies, Delaware, EUA) e o grau de pureza do RNA determinado pela relação A_{260}/A_{280} (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

A integridade do RNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 1,0% em tampão MOPS [MOPS 20 mM (pH 7,0), acetato de sódio 8 mM e EDTA 1mM (pH 8,0)] contendo formaldeído a 2,2 M (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). Como referência, foi utilizado um marcador de RNA (GE Healthcare, Amersham Biosciences do Brasil, São Paulo, Brasil). A eletroforese foi realizada a 32 V por 40 minutos, usando-se cuba de eletroforese horizontal (Gibco BRL, Life Technologies Inc. Gaithersburg, Maryland, EUA) e fonte modelo EPS 200 (GE Healthcare, Amersham Biosciences do Brasil, São Paulo, Brasil). As bandas eletroforéticas foram visualizadas sob luz UV conforme descrito no item 3.6.

3.8. Análise da expressão de mRNA pela PCR em Tempo Real

A medida quantitativa da expressão de mRNA de TLR2 e TLR4, localizados nos cromossomos 4 e 9, respectivamente, foi realizada pela transcrição reversa (RT), seguida da PCR em tempo real utilizando-se o sistema de amplificação *SYBR Green[®] PCR* (Applied Biosystems, Califórnia, EUA). O sinal de fluorescência emitido pelo fluoróforo é detectado em tempo real no equipamento ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, Califórnia, EUA). A análise da expressão gênica foi realizada por método de quantificação relativa utilizando o gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) como controle endógeno.

Para os ensaios de PCR em tempo real, o cDNA foi sintetizado com emprego do Kit *High-Capacity cDNA Archive* (Applied Biosystems, Califórnia, EUA), conforme o protocolo do fabricante. O ensaio de RT foi realizado em termociclador PTC-200 (MJ Research Inc., Waltham, MA, EUA), com as seguintes etapas: 25°C por 10min, 42°C por 50min e 70°C por 15min. O cDNA obtido foi armazenado a -20°C até a sua manipulação. Posteriormente, foi utilizada a PCR em tempo real pelo sistema *SYBR Green*[®].

Todos os oligonucleotídeos utilizados foram selecionados em nosso laboratório através do programa *Primer Premier 5.0* (Premier Biosoft International, Califórnia, EUA) e também através do *Primer Express*[®] 3.0 (Applied Biosystems, Califórnia, EUA).

As regiões analisadas possuem sequência disponível, TLR2 (NM_003264), TLR4 (NM_138554.2) e GAPDH (NM_002046.3) no Banco de genes (*GenBank*) do *National Institute of Health* (NIH) (www.ncbi.nlm.nih.gov) (Tabela 4).

Tabela 4 – Iniciadores utilizados nas reações de PCR

Gene	Iniciador <i>sense</i>	Iniciador <i>anti-sense</i>	Fragmento
TLR 2	5'- ATACAGACAAAGGCATACA-3'	5'-ACCATAAACCCAAACAAC-3'	103 pb
TLR 4	5'-TGCGTGAGACCAGAAAGC-3'	5'-GTCCAGGTTCTTGTTGA-3'	123 pb
GAPDH	5'-GGAAGGTGAAGGTCGGAGTCA-3'	5'-CTGGAAGATGGTGATGGGATTTC-3'	230 pb

Para escolher a melhor concentração dos iniciadores é de grande relevância o Ciclo de *Threshold* (C_T), este é o ponto que detecta o ciclo na qual a reação atinge o limiar da fase exponencial, permitindo a quantificação exata e reprodutível. Os melhores ensaios de amplificação para a PCR em tempo real foram com iniciadores a 200nmol/L ($C_T=29.53$) para TLR4,

500nmol/L ($C_T=31.41$) para TLR2 e 150nmol/L ($C_T=23.23$) para GAPDH, de acordo com a melhor curva de dissociação apresentada (ausência de produtos inespecíficos e/ou *primer dimers*) e menor ciclo de *Threshold* (C_T).

A otimização para a amplificação foi estabelecida com quantidade de cDNA analisado a 2 μ L, *Power SYBR Green PCR Master Mix* a 12,5 μ L e completando o volume com água DEPEC para 25 μ L.

A solução denominada *Power SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Califórnia, EUA) contém: tampão *SYBR Green I Dye*, referência passiva ROX, esta auxilia a normalização dos dados analisados, é necessária para corrigir as flutuações fluorescentes decorrentes nas mudanças de volume ou concentração; dNTPs, enzima AmpliTaq Gold[®] DNA Polymerase e componentes de tampões otimizados.

O programa da PCR em tempo real utilizado foi: (1) um ciclo a 50°C por 2 minutos para ativação da Uracil N-glicosilase - UNG; (2) um ciclo a 95°C por 10 minutos (inativação da UNG); (3) 40 ciclos de 15 segundos a 95°C (desnaturação) e 1 minuto a 60°C (hibridização e extensão). Os dados foram analisados utilizando-se o programa *Sequence Detection Software* v1.2.3 (Applied Biosystems, Califórnia, EUA) que gera curvas semi-logarítmicas dos sinais de amplificação. Acrescentou-se uma etapa denominada curva de dissociação, constituída de: 95°C (15"), 60°C (1') e 95°C (15") para melhor caracterização dos produtos da reação.

A quantidade de cDNA utilizada nos ensaios foi otimizada a partir de uma curva-padrão, realizada com diferentes concentrações de amostra. A curva-padrão permite avaliar a linearidade da amplificação bem como a eficiência da mesma. Segundo Livak e Schmittgen (2001), para a PCR em

tempo real ter eficiência de 100%, a inclinação (do inglês *slope*) da curva-padrão deve ser próximo de -3,3. A eficiência de cada ensaio foi considerada adequada para valores acima de 90%.

Para a quantificação da expressão gênica foi utilizado o método de quantificação relativa, utilizando o gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) como referência. As eficiências das amplificações foram analisadas utilizando como parâmetro o ciclo de Treshold (C_T) (BUSTIN, 2000). A análise da expressão de mRNA dos genes foram realizadas com base na fórmula: $2^{-\Delta C_t}$, na qual ΔC_t corresponde a diferença entre a média C_t da amostra em estudo e a média C_t do controle endógeno GAPDH.

3.9. Pesquisa quantitativa dos agentes infecciosos pela PCR em Tempo Real

As análises de *C.pneumoniae* e de *M. pneumoniae* foram feitas a partir do DNA extraído do material biológico em estudo e analisado pela PCR em tempo real, de regiões específicas do DNA genômico destes microorganismos, utilizando-se o sistema de amplificação *SYBR Green® PCR* (Applied Biosystems, Califórnia, EUA). O sinal de fluorescência emitido pelo fluoróforo é detectado em tempo real no equipamento ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, Califórnia, EUA). A pesquisa do DNA foi realizada por método de quantificação absoluta utilizando-se curva-padrão, de concentrações sabidamente conhecidas, do DNA do microorganismo de interesse.

Todos os oligonucleotídeos utilizados foram selecionados em nosso laboratório através do programa *Primer Premier 5.0* (Premier Biosoft International,

Califórnia, EUA) e também através do *Primer Express*[®] 3.0 (Applied Biosystems, Califórnia, EUA).

As regiões analisadas do *M. pneumoniae* (AY_816340. 1) e *C. pneumoniae* (AE_002161. 1), ambas do gene 16S ribossomal, possuem seqüência disponível no Banco de genes (GenBank) do *National Institute of Health* (NIH) (www.ncbi.nlm.nih.gov) (Tabela 5).

Tabela 5 – Iniciadores utilizados na reação de PCR em tempo real

Gene	Iniciador <i>sense</i>	Iniciador <i>anti-sense</i>	Fragmento
MP	5'-GGGGTGGATCACCTCCTTTC-3'	5'-GCATCCACCATAAGCCCTTAGT-3'	188 pb
CP	5'-GACCTTACCTGGACTTGACATG-3'	5'-TGTGTATCTGTCCTTGCGGAAA-3'	69 pb

Abreviações: MP, *Mycoplasma pneumoniae*; CP, *Chlamydia pneumoniae*

Para PCR em tempo real, o DNA foi obtido conforme descrito no item 3.6. Foi utilizado volume final de 25 µL por reação. Os ensaios foram realizados no equipamento ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, Califórnia, EUA).

A especificidade da reação é dada pela temperatura de desnaturação ou *Melting* (T_m), temperatura na qual o produto amplificado está desnaturado pela metade (50%). Esta etapa ocorre ao final do último ciclo da reação e é visualizada como curva de dissociação.

É de grande importância, também, verificar o Ciclo de *Threshold* (C_T), o ponto na qual a fluorescência de determinada amostra é detectada, esta depende da quantidade inicial da amostra e da eficiência de amplificação.

Foi realizada uma PCR convencional para obter fragmentos amplificados do DNA de *M. pneumoniae*, com um controle interno e posterior clonagem do fragmento de DNA de *M. pneumoniae* utilizando-se o Kit *pGEM* –

T Easy Vector System I (Promega, Wisconsin, EUA), para obter cópias em concentrações diversas ($10^5 - 10^2$ CFU/mL), de acordo com o manual do fabricante. As diferentes concentrações do DNA de *M. pneumoniae* serviram para construção de uma curva-padrão, necessária para análise quantitativa das amostras positivas. A otimização para a amplificação de *M. pneumoniae* foi estabelecida com iniciadores a 100 nmol/L, quantidade de DNA analisado a 1 µL, *Power SYBR Green PCR Master Mix* a 12,5 µL e completando o volume com água miliQ para 25 µL.

A construção da curva-padrão para análise quantitativa de *C. pneumoniae* foi efetuada a partir da concentração de DNA clamidial. Extraiu-se uma determinada amostra de cultura de *C. pneumoniae* AR-39, adquiridas do laboratório de Virologia do Instituto Adolfo Lutz, através do Kit *QIAamp DNA* (Qiagen, Colônia, Alemanha). O DNA foi quantificado por espectrofotometria em 260 nm utilizando Nanodrop D-1000 (Nanodrop Technologies, Delaware, EUA) e a pureza do DNA determinada pela relação A_{260}/A_{280} (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

Sabendo-se a sequência completa deste microorganismo, disponível no Banco de genes (GenBank) do *National Institute of Health* (NIH) (www.ncbi.nlm.nih.gov) e da concentração da amostra de DNA definiu-se o número de cópias contidas em determinada quantidade de amostra de *C. pneumoniae*. Resumidamente, a partir da sequência de referência da *C. pneumoniae* (AE_002161.1) inseriu-se a mesma no programa OLIGO CALCULATOR (www.pitt.edu/~rsup/OligoCalc.html), a fim de se obter o peso molecular em Daltons (g/M). Este foi multiplicado por 2 por se tratar de dupla-fita. Sabendo-se que X valor em g/M equivale a 6×10^{-23} cópias (número de Avogrado) e também sabendo a concentração de DNA da amostra extraída

(através do Nanodrop), foi possível realizar a relação entre cópias/mL e determinar a curva-padrão.

Sendo assim, foi feita uma curva-padrão de $10^6 - 10^2$ CFU/mL. A otimização para a amplificação de *C. pneumoniae* foi estabelecida com iniciadores a 100 nmol/L, quantidade de DNA analisado a 4 µL, *Power SYBR Green PCR Master Mix* a 12,5 µL e completando o volume com água miliQ para 25 µL.

O programa da PCR em tempo real utilizado foi constituído de: (1) um ciclo a 50°C por 2 minutos para ativação da Uracil N-glicosilase - UNG; (2) um ciclo a 95°C por 10 minutos (inativação da UNG); (3) 40 ciclos de 15 segundos a 95°C (desnaturação) e 1 minuto a 60°C (hibridização e extensão). Acrescentou-se uma etapa denominada curva de dissociação, constituída de: 95°C (15"), 60°C (1') e 95°C (15").

Os dados foram analisados utilizando-se o programa *Sequence Detection Software* v1.2.3 (Applied Biosystems, Califórnia, EUA) que gera curvas semi-logarítmicas dos sinais de amplificação, caso as amostras sejam positivas.

3.10. Controle de qualidade da PCR

As PCRs foram monitorizadas utilizando-se controle de reagentes (tubo no qual não se adiciona a amostra de DNA ou cDNA) em cada conjunto de reações. As PCRs em Tempo Real foram realizadas em duplicata para cada amostra.

Posteriormente à RT-PCR foi realizada PCR-GAPDH para analisar a integridade do cDNA. A amplificação do cDNA da enzima gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foi empregada porque esta enzima é expressa de forma constitutiva em todas as células de mamíferos (SUGIMOTO et al., 1999 apud SANTOS, 2003). Todas as sequências dos iniciadores usadas neste estudo foram analisados pelo programa *BLAST* (www.ncbi.nlm.nih.gov), a fim de se averiguar a especificidade das sequências usadas.

Nã PCR-GAPDH foi utilizado 2 µL de cDNA, iniciadores para GAPDH a 100 nmoles/L (Integrated DNA Technologies, Coralville, EUA), descrito na Tabela 4, dNTPs 0,2 mmoles/L (GE Healthcare, Amersham Biosciences do Brasil, São Paulo, SP), DNA polimerase 1 U e tampão de PCR (Biotools, Madrid, Espanha), completando o volume com água DEPEC para 50µL. Foi realizado no termociclador PTC-200 (MJ Research, Inc., Massachussets, EUA), utilizando-se o programa: etapa inicial a 96⁰C por 3min.; 42 ciclos de: 94⁰C por 1min., 55⁰C por 1min. e 72⁰C por 30 segundos e etapa final a 72⁰C por 10min.

Os produtos de PCR foram avaliados por eletroforese em gel de agarose a 2%, em tampão TBE 0,5X por 40min., 60 mA a 100 V e analisados conforme descrito no item 3.6. Como referência foram utilizados marcadores de tamanho molecular de DNA de 100 pb (Invitrogen Corporation, Califórnia, EUA).

Nas PCRs em tempo real para os agentes infecciosos foram utilizados controles-positivo (curvas-padrão) e controles-negativo (ausência de DNA).

Para verificação da integridade do DNA em estudo, realizou-se PCR em tempo real para amplificação da β -actina, um controle endógeno. O iniciador corresponde a sequência disponível (NM_001101.2) no Banco de genes (*GenBank*) do *National Institute of Health* (NIH) (www.ncbi.nlm.nih.gov). (Tabela 6). A otimização para a amplificação da β -actina foi estabelecida com iniciadores a 200 nmol/L, quantidade de DNA analisado a 4 μ L, *Power SYBR Green PCR Master Mix* a 12,5 μ L e completando o volume com água miliQ para 25 μ L.

Tabela 6 – Iniciadores utilizados como controle de qualidade

Gene	Iniciador <i>sense</i>	Iniciador <i>anti-sense</i>	Fragmento
β -ACTINA	5'-AGCGGGAAATCGTGCGTG-3'	5'-CAGGGTACATGGTGGTGC-3'	309
β -2- MICROGLOBULINA	5'-TGCTGTCTCCATGTTTGATGTATC-3'	5'-GGGGTGGATCACCTCCTTTC-3'	86
UBIQUITINA	5'-ATTTGGGTCGCGGTTCTT-3'	5'-TGCCTTGACATTCTCGATGGT-3'	133

Na PCR em tempo real para análise da expressão de mRNA de TLR2 e TLR4 foi estabelecido qual seria o melhor controle endógeno para as amostras de estudo, através de ensaios com três tipos de controle endógenos: GAPDH, β -2-microglobulina e Ubiquitina. O melhor controle endógeno é o que possui menor variação entre os Cts das amostras de estudo, dessa forma, o escolhido foi o GAPDH.

As regiões analisadas do GAPDH (descrito na Tabela 4, anterior) (NM_002046.3), β -2-microglobulina (NM_004048.2), Ubiquitina (NM_021009.4) possuem sequência disponível no Banco de genes (*GenBank*) do *National Institute of Health* (NIH) (www.ncbi.nlm.nih.gov) (Tabela 6). A otimização foi estabelecida com iniciadores a 150 nmol/L, quantidade de cDNA analisado a

2 µL, *Power SYBR Green PCR Master Mix* a 12,5 µL e completando o volume com água DEPEC para 25 µL.

O programa da PCR em tempo real utilizado foi constituído de: (1) um ciclo a 50°C por 2 minutos para ativação da Uracil N-glicosilase - UNG; (2) um ciclo a 95°C por 10 minutos (inativação da UNG); (3) 40 ciclos de 15 segundos a 95°C (desnaturação) e 1 minuto a 60°C (hibridização e extensão). Acrescentou-se uma etapa denominada curva de dissociação, constituída de: 95°C (15"), 60°C (1') e 95°C (15").

Os dados foram analisados utilizando-se o programa *Sequence Detection Software* v1.2.3 (Applied Biosystems, Califórnia, EUA) que gera curvas semi-logarítmicas dos sinais de amplificação, caso as amostras sejam positivas.

4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram analisados através dos programas R® 2.6.2. (Fundação R, Viena, Áustria), Minitab® 15 (Minitab Inc, Pensilvânia, EUA) e SPSS® 15.0 (SPSS Inc., Chicago, EUA).

Inicialmente, foi feita a análise descritiva unidimensional e multidimensional. A normalidade dos dados foi verificada através dos testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk (NETER et al., 1996). Realizou-se a análise dos dados categorizados para comparação dos grupos, em cada técnica empregada. Os grupos foram, então, comparados em relação às demais variáveis por meio dos testes *t-Student* (teste paramétrico de médias que supõe distribuição normal para os dados) (CONOVER, 1999).

Para averiguar as correlações entres os parâmetros analisados utilizou-se o teste de correlação de Spearman. O nível de significância estabelecido para os testes foi $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1. Imunohistoquímica

As amostras de estudo foram divididas em dois grupos: o Grupo 1(G1), constituído de aortas ascendentes, com aterosclerose leve ou moderada e o Grupo 2 (G2), constituído de aneurismas aórticos, que apresentam aterosclerose intensa.

Todas as 27 amostras (G1 + G2) apresentaram positividade para os antígenos em estudo: *C. pneumoniae*, *M. pneumoniae*, TLR2 e TLR4. Para a semiquantificação do G1 foram descartadas duas amostras de estudo, por que não possuíam as camadas íntimas e adventícias.

A análise dos dados para a Técnica de Imunohistoquímica foi realizada através de uma semiquantificação subjetiva, na qual os valores obtidos são variáveis qualitativas ordinais, dessa forma, estatisticamente não é possível comparar os valores como médias. Os valores obtidos correspondem às categorias: 0 (ausente); 1 (discreto e focal); 2 (moderado e focal) e 3 (intenso e difuso).

Na camada íntima do G1, observou-se para os quatro antígenos de interesse, percentual maior na categoria 1, referente à positividade discreta e focal nas amostras analisadas.

Na camada íntima do G2, o *M. pneumoniae* e o TLR4 apresentaram maior percentual na categoria 3 (intenso e difuso), enquanto que a *C. pneumoniae* e o TLR2 apresentaram maior percentual na categoria 1 (discreto e focal).

Na Tabela 7 são apresentadas as porcentagens de cada categoria (0 a 3) para cada antígeno de estudo, na camada íntima, nos diferentes grupos analisados.

Tabela 7 – Análise descritiva dos valores obtidos na camada íntima

Grupo	Antígeno	Quantificação				Total
		0	1	2	3	
G1 (aortas ateroscleróticas) N=11	MP	18,18±11,63	54,55±15,01	18,18±11,63	9,09±11,63	100
	CP	9,09±8,67	45,45±15,01	36,36±14,50	9,09±8,67	100
	TLR2	9,09±8,67	45,45±15,01	27,27±13,43	18,18±8,67	100
	TLR4	9,09±8,67	54,55±15,01	18,18±11,63	18,18±8,67	100
G2 (aneurisma) N=14	MP	0,00±0,00	14,29±9,35	35,71±12,81	50,00±0,00	100
	CP	0,00±0,00	64,29±12,81	14,29±9,35	21,43±0,00	100
	TLR2	7,14±6,88	57,14±13,23	35,71±12,81	0,00±6,88	100
	TLR4	0,00±0,00	7,14±6,88	35,71±12,81	57,14±0,00	100

Nota: Os valores estão em percentual médio ± erro-padrão. Abreviações: MP (*Mycoplasma pneumoniae*); CP (*Chlamydia pneumoniae*); TLR2 (*Toll-like receptor 2*) e TLR4 (*Toll-like receptor 4*).

Na Tabela 8 são apresentadas as porcentagens de cada categoria (0 a 3) para cada antígeno de estudo, na camada adventícia, nos diferentes grupos analisados. Observou-se, na camada adventícia do G1, percentuais iguais nas categorias 1 e 2 para reação de IHQ de *M. pneumoniae*. Já para *C. pneumoniae* foi maior na categoria 2. Para o TLR2 e o TLR4, o percentual foi maior na categoria 1, referente à positividade discreta e focal nas amostras analisadas.

Na camada adventícia do G2, o *M. pneumoniae* e o TLR4 apresentaram maior percentual na categoria 3 (intenso e difuso), enquanto que a reação para *C. pneumoniae* apresentou percentual maior na categoria 2 e a reação para TLR2 apresentou percentual igual tanto na categoria 1, quanto na categoria 2.

Tabela 8 – Análise descritiva dos valores obtidos na camada adventícia

Grupo	Antígeno	Quantificação				Total
		0	1	2	3	
G1 (aorta) N=11	MP	4,76±6,57	38,10±14,99	38,10±14,99	19,05±12,12	100
	CP	4,76±6,57	9,52±9,06	76,19±13,14	9,52±9,06	100
	TLR2	10,00±9,49	40,00±15,49	30,00±14,49	20,00±12,65	100
	TLR4	5,26±7,24	52,63±16,20	31,58±15,08	10,53±9,96	100
G2 (aneurisma) N=14	MP	3,45±4,79	13,79±9,06	34,48±12,48	48,28±13,12	100
	CP	3,45±4,79	13,79±9,06	48,28±13,12	34,48±12,48	100
	TLR2	7,14±6,88	35,71±12,81	35,71±12,81	21,43±10,97	100
	TLR4	3,33±4,63	3,33±4,63	40,00±12,65	53,33±12,88	100

Nota: Os valores estão em percentual médio ± erro-padrão. Abreviações: MP (*Mycoplasma pneumoniae*); CP (*Chlamydia pneumoniae*); TLR2 (*Toll-like receptor 2*) e TLR4 (*Toll-like receptor 4*).

As Figuras 5 e 6, a seguir, apresentam gráficos construídos para melhor visualização das diferenças quantitativas de cada antígeno estudado na camada íntima dos grupos 1 e 2.

Figura 5 – Proporção dos antígenos *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*, TLR2 e TLR4 na camada íntima das aortas estudadas

Figura 6 – Proporção dos antígenos *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*, TLR2 e TLR4 na camada adventícia das aortas estudadas

As Figuras 7 e 8, a seguir, apresentam gráficos construídos para melhor visualização das diferenças quantitativas de cada antígeno estudado na camada

adventícia dos grupos 1 e 2.

Figura 7 – Proporção dos antígenos *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*, TLR2 e TLR4 na camada íntima nos grupos 1 e 2

Figura 8 – Proporção dos antígenos *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*, TLR2 e TLR4 na camada adventícia nos grupos 1 e 2

Na reação de Imunohistoquímica, o grupo 2 (aneurismas aórticos) apresentou maior quantidade de *M. pneumoniae* e TLRs do que o grupo 1 (aortas ascendentes). A *C. pneumoniae* mostrou-se igual nos dois grupos, porém, no grupo 2 apresentou uma quantidade significativamente maior na adventícia do que na

íntima ($p=0,040$). A comparação da quantidade dos antígenos, em cada respectiva camada vascular, entre os grupos, foi:

- Para o MP sua presença é maior na íntima do G2 do que na íntima do G1 ($p=0,012$);
- O TLR4 apresentou maior quantidade de antígenos na íntima do G2 em relação ao G1 ($p=0,017$), assim como na adventícia ($p=0,017$) (Tabela 9).

Tabela 9 – Análise descritiva e comparação entre as camadas aórticas e entre os grupos G1 versus G2 para IHQ

Grupos	G1 (aortas) N=11		Íntima x Adventícia	G2 (aneurismas) N=14		Íntima x Adventícia	G1 x G2	
	Íntima	Adventícia		Íntima	Adventícia		Íntima	Adventícia
MP	1	1 e 2	$p=0,498$	3	3	$p=0,990$	$p=0,012$	$p=0,270$
CP	1	2	$p=0,218$	1	2	$p=0,040$	$p=0,271$	$p=0,445$
TLR2	1	1	$p=0,995$	1	1 e 2	$p=0,445$	$p=0,306$	$p=0,986$
TLR4	1	1	$p=0,875$	3	3	$p=0,968$	$p=0,017$	$p=0,017$

Nota: Valores representam a categoria com maior percentual: 0 (ausente), 1 (discreto e focal), 2 (moderado e focal) e 3 (intenso e difuso). Os resultados foram comparados por teste-*t* de Student. MP=*M. pneumoniae*; CP=*C. pneumoniae*; TLR2 = Toll-like receptor 2 e TLR4 = Toll-like receptor 4.

As análises das reações de Imunohistoquímica apresentaram as seguintes comparações:

a) Agentes infecciosos:

No Grupo 1 (aortas ascendentes), não houve diferenças significativas comparando-se *C. pneumoniae* com *M. pneumoniae* ($p=0,775$) tanto na camada íntima, quanto na camada adventícia ($p=0,305$). No Grupo 2, também, não houve diferenças significativas comparando-se *C. pneumoniae* com *M. pneumoniae* ($p=0,051$) tanto na camada íntima, quanto na camada adventícia ($p=0,880$) (Tabela 10).

Tabela 10 – Comparação entre os agentes infecciosos em cada grupo de estudo

Grupos	G1 (aortas) N=11		G2 (aneurismas) N=14	
Antígenos	<i>Chlamydia pneumoniae</i>			
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Íntima	Adventícia	Íntima	Adventícia
	0,775	0,305	0,051	0,880

Nota: Valores são apresentados como coeficientes de significância (p). Os resultados foram comparados por teste- t de Student.

Comparando os grupos entre si (G1 x G2), constatou-se que há diferença significativa de antígenos de *M. pneumoniae* na camada íntima ($p=0,012$), mas não na camada adventícia ($p=0,270$). Enquanto que não houve diferença estatisticamente significativa em relação à presença da *C. pneumoniae* na camada íntima ($p=0,271$) com a mesma na adventícia ($p=0,445$) (Tabela 9, anterior).

b) Receptores Toll-like:

No Grupo 1, não houve diferenças significativas comparando-se TLR2 com TLR4 tanto na camada íntima ($p=0,962$), quanto na camada adventícia ($p=0,895$). No Grupo 2, houve diferença significativa comparando-se antígenos de TLR2 com antígenos de TLR4 ($p=0,003$) na camada íntima, mas não na camada adventícia ($p=0,077$) (Tabela 11).

Tabela 11 – Comparação entre os TLRs em cada grupo de estudo

Grupos	G1 (aorta) N=11		G2 (aneurisma) N=14	
Antígenos	TLR2			
	Íntima	Adventicia	Íntima	Adventicia
TLR4	0,962	0,895	0,003	0,077

Nota: Valores são apresentados como coeficientes de significância (p). Os resultados foram comparados por teste- t de Student.

A comparação entre G1 e G2 detectou diferença estatisticamente significativa com respeito ao TLR4, tanto na camada íntima ($p=0,017$) quanto na adventícia ($p=0,017$), o mesmo não ocorreu para o TLR2 (Tabela 9, anterior).

Correlações foram realizadas em cada grupo. Os resultados mais eminentes do grupo 1 (Tabela 12) são descritos a seguir:

- Verificou-se correlação positiva e significativa da quantidade de antígenos de *M. pneumoniae* com a quantidade de antígenos de *C. pneumoniae*, na camada íntima ($r=0,810$ e $p=0,003$);
- A quantidade de antígenos de TLR2, íntima, correlacionou-se com a mesma na camada adventícia ($r=1,000$ e $p<0,001$);
- Observou-se que a quantidade de antígenos de TLR4, na camada íntima, tem correlação positiva e significativa com a quantidade de antígenos de TLR4 na camada adventícia ($r=0,687$ e $p=0,041$);
- Constatou-se correlação positiva e significativa do aumento da quantidade de infiltrado inflamatório com o aumento da quantidade de células adiposas (gordura) ($r=0,714$ e $p=0,020$).

Tabela 12 – Correlações no grupo 1 (aortas ascendentes) entre o infiltrado inflamatório versus gordura (células adiposas), infiltrado inflamatório versus agentes infecciosos, infiltrado inflamatório versus Receptores *Toll-like*, gordura versus agentes infecciosos, gordura versus Receptores *Toll-like*, agentes infecciosos entre si, agentes infecciosos versus Receptores *Toll-like* e Receptores *Toll-like* entre si

Variáveis	r	p
Inflamação adventícia x gordura adventícia	0,714	0,020
Inflamação adventícia x íntima MP	0,163	0,652
Inflamação adventícia x íntima CP	0,486	0,154
Inflamação adventícia x adventícia MP	0,163	0,653
Inflamação adventícia x adventícia CP	0,000	1,000
Inflamação adventícia x íntima TLR2	0,279	0,435
Inflamação adventícia x adventícia TLR2	0,279	0,435
Inflamação adventícia x íntima TLR4	0,082	0,823
Inflamação adventícia x adventícia TLR4	0,204	0,598
Gordura adventícia x íntima MP	0,371	0,292
Gordura adventícia x íntima CP	0,618	0,057
Gordura adventícia x adventícia MP	0,086	0,813
Gordura adventícia x adventícia CP	0,387	0,269
Gordura adventícia x íntima TLR2	-0,039	0,916
Gordura adventícia x adventícia TLR2	-0,039	0,916
Gordura adventícia x íntima TLR4	-0,378	0,282
Gordura adventícia x adventícia TLR4	-0,061	0,876
Íntima MP x íntima CP	0,810	0,003
Íntima MP x adventícia MP	0,620	0,056
Íntima MP x adventícia CP	0,418	0,229
Íntima CP x adventícia MP	0,491	0,149
Íntima CP x adventícia CP	0,540	0,107
Adventícia MP x adventícia CP	0,583	0,077
Íntima MP x íntima TLR2	0,154	0,652
Íntima MP x adventícia TLR2	0,147	0,686
Íntima MP x íntima TLR4	-0,440	0,176
Íntima MP x adventícia TLR4	-0,412	0,270
Íntima CP x íntima TLR2	,119	0,726
Íntima CP x adventícia TLR2	0,078	0,830
Íntima CP x íntima TLR4	-0,193	0,570
Íntima CP x adventícia TLR4	-0,159	0,684
Adventícia MP x adventícia TLR2	0,122	0,736
Adventícia MP x adventícia TLR4	-0,378	0,315
Adventícia CP x adventícia TLR2	-0,204	0,572

Adventícia CP x adventícia TLR4	-0,306	0,423
Íntima TLR2 x adventícia MP	0,122	0,736
Íntima TLR2 x adventícia CP	-0,204	0,572
Íntima TLR2 x adventícia TLR2	1,000	<0,001
Íntima TLR2 x íntima TLR4	0,169	0,619
Íntima TLR2 x adventícia TLR4	0,077	0,843
Íntima TLR4 x adventícia MP	0,181	0,616
Íntima TLR4 x adventícia CP	0,000	1,000
Íntima TLR4 x adventícia TLR2	0,160	0,658
Íntima TLR4 x adventícia TLR4	0,687	0,041

Nota: r = Coeficiente de correlação de Spearman; MP = *M. pneumoniae*; CP = *C. pneumoniae*; TLR2 = *Toll-like receptor 2* e TLR4 = *Toll-like receptor 4*.

Os resultados mais eminentes do grupo 2 (Tabela 13) apresentam-se adiante:

- Verificou-se correlação positiva e significativa da quantidade de antígenos de *C. pneumoniae*, na camada íntima, com a quantidade de gordura ($r=0,575$ e $p=0,031$);
- Observou-se que a quantidade de antígenos de TLR4, na camada íntima, tem correlação positiva e significativa com a quantidade de antígenos de TLR4 na camada adventícia ($r=0,713$ e $p=0,004$). Além disso, constatou-se correlação positiva e significativa da quantidade de TLR4, na camada íntima, com a quantidade de TLR2 na adventícia ($r=0,569$ e $p=0,034$).

Tabela 13 – Correlações no grupo 2 (aneurisma) entre o infiltrado inflamatório versus gordura (células adiposas), infiltrado inflamatório versus agentes infecciosos, infiltrado inflamatório versus Receptores *Toll-like*, gordura versus agentes infecciosos, gordura versus Receptores *Toll-like*, agentes infecciosos entre si, agentes infecciosos versus Receptores *Toll-like* e Receptores *Toll-like* entre si

Variáveis	r	p
Inflamação adventícia x gordura adventícia	0,170	0,560
Inflamação adventícia x íntima MP	0,189	0,518
Inflamação adventícia x íntima CP	0,044	0,881
Inflamação adventícia x adventícia MP	0,039	0,895
Inflamação adventícia x adventícia CP	0,097	0,742
Inflamação adventícia x íntima TLR2	0,115	0,695
Inflamação adventícia x adventícia TLR2	0,496	0,071
Inflamação adventícia x íntima TLR4	0,298	0,301
Inflamação adventícia x adventícia TLR4	0,230	0,428
Gordura adventícia x íntima MP	0,028	0,923
Gordura adventícia x íntima CP	0,575	0,031
Gordura adventícia x adventícia MP	-0,177	0,545
Gordura adventícia x adventícia CP	-0,174	0,551
Gordura adventícia x íntima TLR2	-0,149	0,612
Gordura adventícia x adventícia TLR2	-0,352	0,217
Gordura adventícia x íntima TLR4	-0,154	0,599
Gordura adventícia x adventícia TLR4	0,077	0,794
Íntima MP x íntima CP	0,320	0,265
Íntima MP x adventícia MP	0,077	0,794
Íntima MP x adventícia CP	-0,452	0,104
Íntima CP x adventícia MP	-0,467	0,092
Íntima CP x adventícia CP	-0,110	0,707
Adventícia MP x adventícia CP	0,044	0,882
Íntima MP x íntima TLR2	0,044	0,881
Íntima MP x adventícia TLR2	-0,254	0,381
Íntima MP x íntima TLR4	0,117	0,691
Íntima MP x adventícia TLR4	0,020	0,947
Íntima CP x íntima TLR2	0,314	0,274
Íntima CP x adventícia TLR2	-0,247	0,394
Íntima CP x íntima TLR4	0,006	0,984
Íntima CP x adventícia TLR4	-0,042	0,887
Adventícia MP x adventícia TLR2	-0,142	0,628
Adventícia MP x adventícia TLR4	-0,118	0,688
Adventícia CP x adventícia TLR2	0,152	0,603

Adventícia CP x adventícia TLR4	-0,118	0,688
Íntima TLR2 x adventícia MP	-0,229	0,430
Íntima TLR2 x adventícia CP	-0,117	0,545
Íntima TLR2 x adventícia TLR2	0,513	0,060
Íntima TLR2 x adventícia TLR4	0,408	0,148
Íntima TLR2 x íntima TLR4	0,405	0,151
Íntima TLR4 x adventícia MP	-0,165	0,574
Íntima TLR4 x adventícia CP	-0,021	0,944
Íntima TLR4 x adventícia TLR2	0,569	0,034
Íntima TLR4 x adventícia TLR4	0,713	0,004

Nota: r = Coeficiente de correlação de Spearman; MP = *M. pneumoniae*; CP = *C. pneumoniae*; TLR2 = *Toll-like receptor 2* e TLR4 = *Toll-like receptor 4*.

5.2. Hibridização *in situ*

As amostras de estudo foram divididas em dois grupos: o Grupo 1 (G1), constituído de aortas ascendentes, com aterosclerose leve ou moderada e o Grupo 2 (G2), constituído de aneurismas aórticos, o qual apresentam aterosclerose intensa.

Para a semiquantificação do Grupo 1 foram descartadas duas amostras de estudo, pois não possuíam as camadas íntimas e adventícias. Além disso, faltou material para análise de outra amostra de estudo, contabilizando 10 amostras para a reação de HIS. Neste grupo a positividade foi: *C. pneumoniae* (80%), *M. pneumoniae* (90%), TLR2 (100%) e TLR4 (100%).

O Grupo 2 é constituído de 14 amostras de estudo, a positividade foi: *C. pneumoniae* (71,42%), *M. pneumoniae* (85,71%), TLR2 (92,85%) e TLR4 (100%).

A análise dos dados estatísticos para a técnica de HIS foi realizada através de uma semiquantificação subjetiva, na qual os valores obtidos são variáveis qualitativas ordinais, dessa forma, não é possível comparar os valores como médias.

Os valores obtidos correspondem às categorias: 0 (ausente); 1 (discreto e focal); 2 (moderado e focal) e 3 (intenso e difuso).

Na camada íntima do G1 observou-se para os quatro genes de interesse, percentual maior na categoria 1, referente à positividade discreta e focal nas amostras analisadas. Contudo, a semiquantificação do TLR4 mostrou percentuais iguais nas categorias 1 e 2.

Na camada íntima do G2, as semiquantificações foram bastante diversificadas. A reação para *M. pneumoniae* e para *C. pneumoniae* apresentou maior percentual na categoria 0, (ausente). Para o TLR2 o maior percentual foi na categoria 3 e, finalmente, para o TLR4 o percentual foi maior na categoria 2.

Na Tabela 14 apresentam-se as porcentagens de cada categoria (0 a 3) para cada análise, na camada íntima, nos diferentes grupos analisados.

Tabela 14 – Análise descritiva dos valores obtidos na camada íntima para HIS

Grupos	Genes	Quantificação				Total
		0	1	2	3	
G1 (aorta) N=10	MP	10,00±9,49	50,00±15,81	20,00±12,65	20,00±12,65	100
	CP	38,10±14,99	47,62±15,41	4,76±6,57	9,52±9,06	100
	TLR2	4,55±6,28	54,55±15,01	36,36±14,50	4,55±6,28	100
	TLR4	4,76±6,57	38,10±14,99	38,10±14,99	19,05±12,12	100
G2 (aneurisma) N=14	MP	42,86±13,23	35,71±12,81	14,29±9,35	7,14±6,88	100
	CP	57,14±13,23	28,57±12,07	7,14±6,88	7,14±6,88	100
	TLR2	14,29±9,35	14,29±9,35	28,57±12,07	42,86±13,23	100
	TLR4	3,45±4,79	27,59±11,74	48,28±13,12	20,69±10,64	100

Nota: Os valores estão em percentual médio ± erro-padrão. Abreviações: MP (*Mycoplasma pneumoniae*); CP (*Chlamydia pneumoniae*); TLR2 (*Toll-like receptor 2*) e TLR4 (*Toll-like receptor 4*).

Na Tabela 15 exibem-se as porcentagens de cada categoria (0 a 3) para cada gene de estudo, na camada adventícia, nos diferentes grupos analisados.

Tabela 15 – Análise descritiva dos valores obtidos na camada adventícia para HIS

Grupos	Antígenos	Quantificação				Total
		0	1	2	3	
G1 (aorta) N=10	MP	22,22±13,86	55,56±16,56	11,11±10,48	11,11±13,86	100
	CP	23,53±14,55	58,82±16,88	11,76±11,05	5,88±14,55	100
	TLR2	10,53±9,96	42,11±16,02	42,11±16,02	5,26±9,96	100
	TLR4	10,53±9,96	52,63±16,20	31,58±15,08	5,26±9,96	100
G2 (aneurisma) N=14	MP	14,29±9,35	50,00±13,36	14,29±9,35	21,43±9,35	100
	CP	34,48±12,48	48,28±13,12	3,45±4,79	13,79±12,48	100
	TLR2	28,57±12,07	7,14±6,88	35,71±12,81	28,57±12,07	100
	TLR4	14,29±9,35	14,29±9,35	50,00±13,36	21,43±9,35	100

Nota: Os valores estão em percentual médio ± erro-padrão. Abreviações: MP (*Mycoplasma pneumoniae*); CP (*Chlamydia pneumoniae*); TLR2 (*Toll-like receptor 2*) e TLR4 (*Toll-like receptor 4*).

Observou-se nas camadas adventícias do G1 percentuais iguais nas categorias 1 e 2 para reação de HIS de TLR2. Já para *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae* e TLR4 foram maiores na categoria 1.

Nas análises das reações de HIS, nas camadas adventícias do G2, o *M. pneumoniae* e a *C. pneumoniae* apresentaram maior percentual na categoria 1, enquanto que as reações para TLR2 e TLR4 apresentaram percentuais maiores na categoria 2.

As Figuras 9, 10, 11 e 12, a seguir, apresentam gráficos construídos para melhor visualização das diferenças quantitativas de cada gene estudado, nas camadas, íntima e adventícia, dos grupos 1 e 2 para a Técnica de HIS.

Figura 9 – Proporção dos genes *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*, TLR2 e TLR4 na camada **íntima** das aortas estudadas para técnica de HIS

Figura 10 – Proporção dos genes *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*, TLR2 e TLR4 na camada **adventícia** das aortas estudadas para técnica de HIS

Figura 11 – Proporção dos genes *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*, TLR2 e TLR4 na camada íntima nos grupos 1 e 2 para reação de HIS

Figura 12 – Proporção dos genes *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*, TLR2 e TLR4 na camada adventícia nos grupos 1 e 2 para reação de HIS

Pela reação de Hibridização *in situ*, o Grupo 2 (aneurismas aórticos) apresentou maior quantidade de TLRs do que o Grupo 1 (aortas ascendentes). O *M. pneumoniae* e a *C. pneumoniae* apresentaram maior prevalência nas camadas das aortas ascendentes (G1). A relação entre os Grupos 1 e 2, na reação de HIS,

apresentou como único dado significativo, a quantidade de mRNA de TLR2 maior na íntima do G2 do que na íntima do G1 ($p=0,042$) (Tabela 16).

Tabela 16 – Análise descritiva e comparação entre as camadas aórticas e entre os grupos G1 versus G2 para HIS

Grupo s	G1 (aortas) N=10		Íntima x Adventícia	G2 (aneurisma) N=14		Íntima x Adventícia	G1 x G2	
	Íntima	Adventícia		Íntima	Adventícia		Íntima	Adventícia
MP	1	1	$p=0,809$	1	1	$p=0,324$	$p=0,304$	$p=0,891$
CP	1	1	$p=0,847$	0	1	$p=0,566$	$p=0,768$	$p=0,750$
TLR2	1	1 e 2	$p=0,927$	3	2	$p=0,674$	$p=0,042$	$p=0,102$
TLR4	1 e 2	1	$p=0,720$	2	2	$p=0,651$	$p=0,943$	$p=0,219$

Nota: Valores representam a categoria com maior percentual: 0 (ausente), 1 (discreto e focal), 2 (moderado e focal) e 3 (intenso e difuso). Os resultados foram comparados por teste-*t* de Student. MP = *M. pneumoniae*; CP = *C. pneumoniae*; TLR2 = Toll-like receptor 2 e TLR4 = Toll-like receptor 4.

As análises das reações de Hibridização *in situ* apresentaram as seguintes comparações:

a) Agentes infecciosos:

No Grupo 1 e no Grupo 2, não houve diferenças significativas comparando-se *C. pneumoniae* com *M. pneumoniae*, como demonstra a Tabela 17. Comparando-se os grupos (G1 x G2), constatou-se que não há diferenças significativas de cada agente infeccioso tanto na íntima, quanto na adventícia (Tabela 16, anterior).

Tabela 17 – Comparação entre os agentes infecciosos em cada grupo de estudo para HIS

Grupos	G1 (aorta) N=10		G2 (aneurisma) N=14	
	<i>Chlamydia pneumoniae</i>			
Genes	Íntima	Adventícia	Íntima	Adventícia
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	0,359	0,984	0,864	0,478

Nota: Valores são apresentados como coeficientes de significância (*p*). Os resultados foram comparados por teste-*t* de Student.

b) Receptores *Toll-like*:

No Grupo 1 e Grupo 2 não houve diferenças significativas comparando-se TLR2 com TLR4 tanto na camada íntima, quanto na camada adventícia, demonstrado na Tabela 18.

Tabela 18 – Comparação entre os Receptores *Toll-like* em cada grupo de estudo na HIS

Grupos	G1 (aorta) N=10		G2 (aneurisma) N=14	
Genes	TLR2			
	Íntima	Adventicia	Íntima	Adventicia
TLR4	0,716	0,968	0,323	0,683

Nota: Valores são apresentados como coeficientes de significância (*p*). Os resultados foram comparados por teste-*t* de *Student*.

A comparação entre G1 e G2 detectou diferença estatisticamente significativa em relação ao TLR2, apenas na camada íntima ($p=0,042$), como mostra a Tabela 16 (anterior).

Correlações foram realizadas em cada grupo. Os resultados mais interessantes do Grupo 1 (Tabela 19) são expressos a seguir:

- Verificou-se correlação positiva e significativa da quantidade de DNA de *C. pneumoniae* com a quantidade de ribonucleotídeos de *TLR4*, na camada adventícia ($r=0,730$ e $p=0,040$);
- Observou-se que a quantidade de ribonucleotídeos de TLR2 tem correlação positiva e significativa com a quantidade de ribonucleotídeos de TLR4 na camada íntima ($r=0,761$ e $p=0,011$);
- Constatou-se que a quantidade de ribonucleotídeos de TLR2 tem

correlação negativa e significativa com a quantidade de infiltrado inflamatório na camada adventícia ($r=-0,700$ e $p=0,036$);

- Verificou-se correlação positiva e significativa do aumento da quantidade de infiltrado inflamatório com o aumento da quantidade de células adiposas (gordura) ($r=0,700$ e $p=0,036$).

Tabela 19 – Correlações, de HIS, no grupo 1 (aortas ascendentes) entre o infiltrado inflamatório versus gordura (células adiposas), infiltrado inflamatório versus agentes infecciosos, infiltrado inflamatório versus Receptores *Toll-like*, gordura versus agentes infecciosos, gordura versus Receptores *Toll-like*, agentes infecciosos entre si, agentes infecciosos versus Receptores *Toll-like* e Receptores *Toll-like* entre si

Variáveis	r	p
Inflamação adventícia x gordura adventícia	0,700	0,036
Inflamação adventícia x íntima MP	0,050	0,898
Inflamação adventícia x íntima CP	0,158	0,685
Inflamação adventícia x adventícia MP	0,000	1,000
Inflamação adventícia x adventícia CP	0,130	0,759
Inflamação adventícia x íntima TLR2	-0,632	0,068
Inflamação adventícia x adventícia TLR2	-0,700	0,036
Inflamação adventícia x íntima TLR4	-0,537	0,136
Inflamação adventícia x adventícia TLR4	-0,204	0,598
Gordura adventícia x íntima MP	0,231	0,550
Gordura adventícia x íntima CP	-0,427	0,252
Gordura adventícia x adventícia MP	0,040	0,918
Gordura adventícia x adventícia CP	-0,023	0,958
Gordura adventícia x íntima TLR2	-0,190	0,625
Gordura adventícia x adventícia TLR2	-0,235	0,543
Gordura adventícia x íntima TLR4	-0,263	0,493
Gordura adventícia x adventícia TLR4	-0,204	0,598
Íntima MP x íntima CP	0,205	0,570
Íntima MP x adventícia MP	0,616	0,077
Íntima MP x adventícia CP	0,383	0,348
Íntima CP x adventícia MP	-0,334	0,380
Íntima CP x adventícia CP	0,260	0,534
Adventícia MP x adventícia CP	0,063	0,882
Íntima MP x íntima TLR2	0,229	0,524
Íntima MP x adventícia TLR2	0,131	0,738
Íntima MP x íntima TLR4	0,216	0,549
Íntima MP x adventícia TLR4	0,103	0,793
Íntima CP x íntima TLR2	-0,589	0,073
Íntima CP x adventícia TLR2	-0,569	0,110
Íntima CP x íntima TLR4	-0,323	0,363
Íntima CP x adventícia TLR4	-0,097	0,804
Adventícia MP x adventícia TLR2	0,281	0,463
Adventícia MP x adventícia TLR4	-0,041	0,917
Adventícia CP x adventícia TLR2	-0,248	0,553

Adventícia CP x adventícia TLR4	0,730	0,040
Íntima TLR2 x adventícia MP	0,334	0,380
Íntima TLR2 x adventícia CP	0,195	0,643
Íntima TLR2 x adventícia TLR2	0,569	0,110
Íntima TLR2 x íntima TLR4	0,761	0,011
Íntima TLR2 x adventícia TLR4	0,387	0,303
Íntima TLR4 x adventícia MP	0,034	0,930
Íntima TLR4 x adventícia CP	0,248	0,553
Íntima TLR4 x adventícia TLR2	0,537	0,136
Íntima TLR4 x adventícia TLR4	0,538	0,135

Nota: r = Coeficiente de correlação de Spearman; MP = *M. pneumoniae*; CP = *C. pneumoniae*; TLR2 = *Toll-like receptor 2* e TLR4 = *Toll-like receptor 4*.

O Grupo 2 apresentou várias correlações significativas e positivas, expostas na Tabela 20 e relatadas adiante:

- A quantidade de *M. pneumoniae* na camada íntima teve correlação com a mesma na camada adventícia ($r=0,708$ e $p=0,005$);
- Na camada adventícia, a quantidade de *M. pneumoniae* e a quantidade de mRNA do TLR4 correlacionaram-se ($r=0,662$ e $p=0,010$);
- Constatou-se que a quantidade de *M. pneumoniae*, na adventícia, tem correlação positiva e significativa com a quantidade de mRNA do TLR4 na camada íntima ($r=0,604$ e $p=0,022$);
- A quantidade de *C. pneumoniae* na camada íntima teve correlação com a mesma na camada adventícia ($r=0,585$ e $p=0,028$);
- Verificou-se correlação positiva e significativa da quantidade de DNA de *M. pneumoniae* com a quantidade de DNA de *C. pneumoniae*, na camada íntima ($r=0,557$ e $p=0,038$), como também na camada adventícia ($r=0,620$ e $p=0,016$);
- Obteve-se correlação positiva e significativa, na íntima, da quantidade de DNA de *C. pneumoniae* versus mRNA de TLR2 ($r=0,563$ e $p=0,036$).

e na camada adventícia também ($r=0,576$ e $p=0,031$). Também houve correlação positiva e significativa da quantidade de *C. pneumoniae* na adventícia, com a quantidade de TLR2 na íntima ($r=0,733$ e $p=0,003$);

- A concentração de *C. pneumoniae*, na íntima, correlacionou-se com a concentração de TLR4 na adventícia ($r=0,589$ e $p=0,027$), e também com a quantidade de infiltrado inflamatório ($r=0,540$ e $p=0,046$);
- A concentração de *C. pneumoniae*, na adventícia, correlacionou-se com a concentração de TLR4 na íntima ($r=0,582$ e $p=0,029$);
- A quantidade de TLR2 na camada íntima teve correlação com a mesma na camada adventícia ($r=0,758$ e $p=0,002$);
- A quantidade de TLR4 na camada íntima teve correlação com a mesma na camada adventícia ($r=0,607$ e $p=0,021$);
- Verificou-se que a quantidade de ribonucleotídeos de TLR2, na íntima, tem correlação positiva e significativa com a quantidade de TLR4, adventícia ($r=0,619$ e $p=0,018$);
- Observou-se que a quantidade de ribonucleotídeos de TLR2 tem correlação positiva e significativa com a quantidade de ribonucleotídeos de TLR4 na camada íntima ($r=0,719$ e $p=0,004$);
- Constatou-se que a quantidade de ribonucleotídeos de TLR4, íntima, tem correlação positiva e significativa com a quantidade de infiltrado inflamatório na camada adventícia ($r=0,561$ e $p=0,037$).

Tabela 20 – Correlações, de HIS, no grupo 2 (aneurismas) entre o infiltrado inflamatório versus gordura (células adiposas), infiltrado inflamatório versus agentes infecciosos, infiltrado inflamatório versus Receptores *Toll-like*, gordura versus agentes infecciosos, gordura versus Receptores *Toll-like*, agentes infecciosos entre si, agentes infecciosos versus Receptores *Toll-like* e Receptores *Toll-like* entre si

Variáveis	r	p
Inflamação adventícia x gordura adventícia	0,170	0,560
Inflamação adventícia x íntima MP	0,130	0,669
Inflamação adventícia x íntima CP	0,540	0,046
Inflamação adventícia x adventícia MP	0,305	0,288
Inflamação adventícia x adventícia CP	0,202	0,489
Inflamação adventícia x íntima TLR2	0,289	0,317
Inflamação adventícia x adventícia TLR2	0,147	0,617
Inflamação adventícia x íntima TLR4	0,561	0,037
Inflamação adventícia x adventícia TLR4	0,430	0,125
Gordura adventícia x íntima MP	-0,127	0,665
Gordura adventícia x íntima CP	0,049	0,868
Gordura adventícia x adventícia MP	-0,280	0,332
Gordura adventícia x adventícia CP	-0,089	0,762
Gordura adventícia x íntima TLR2	-0,229	0,431
Gordura adventícia x adventícia TLR2	-0,460	0,098
Gordura adventícia x íntima TLR4	-0,110	0,708
Gordura adventícia x adventícia TLR4	-0,278	0,337
Íntima MP x íntima CP	0,557	0,038
Íntima MP x adventícia MP	0,708	0,005
Íntima MP x adventícia CP	0,375	0,187
Íntima CP x adventícia MP	0,478	0,084
Íntima CP x adventícia CP	0,585	0,028
Adventícia MP x adventícia CP	0,630	0,016
Íntima MP x íntima TLR2	0,124	0,673
Íntima MP x adventícia TLR2	0,123	0,676
Íntima MP x íntima TLR4	0,102	0,728
Íntima MP x adventícia TLR4	0,429	0,126
Íntima CP x íntima TLR2	0,563	0,036
Íntima CP x adventícia TLR2	0,326	0,256
Íntima CP x íntima TLR4	0,341	0,233
Íntima CP x adventícia TLR4	0,589	0,027
Adventícia MP x adventícia TLR2	0,364	0,201
Adventícia MP x adventícia TLR4	0,662	0,010
Adventícia CP x adventícia TLR2	0,576	0,031

Adventícia CP x adventícia TLR4	0,521	0,056
Íntima TLR2 x adventícia MP	0,425	0,130
Íntima TLR2 x adventícia CP	0,733	0,003
Íntima TLR2 x adventícia TLR2	0,758	0,002
Íntima TLR2 x íntima TLR4	0,719	0,004
Íntima TLR2 x adventícia TLR4	0,619	0,018
Íntima TLR4 x adventícia MP	0,604	0,022
Íntima TLR4 x adventícia CP	0,582	0,029
Íntima TLR4 x adventícia TLR2	0,510	0,062
Íntima TLR4 x adventícia TLR4	0,607	0,021

Nota: r = Coeficiente de correlação de Spearman; MP = *M. pneumoniae*; CP = *C. pneumoniae*; TLR2 = *Toll-like receptor 2* e TLR4 = *Toll-like receptor 4*.

5.3. Inflamação e gordura

A quantidade de infiltrado inflamatório e de células adiposas (gordura) também foi quantificada nas amostras de estudo para cada grupo, apenas da camada adventícia. Esta quantificação é independente da técnica empregada e da pesquisa a ser realizada. Usou-se a média de três quantificações para cada amostra. Houve diferença estatisticamente significativa em relação à quantidade de inflamação no G1 com o G2 ($p=0,001$). O mesmo ocorreu em relação à quantidade de gordura ($p=0,001$) (Tabela 21).

Tabela 21 – Análise descritiva e comparação entre os grupos G1 versus G2 para infiltrado inflamatório e células adiposas

Grupos das Amostras	G1 (aortas) N=10		G2 (aneurisma) N=14		G1 x G2	
	Íntima	Adventícia	Íntima	Adventícia	Íntima	Adventícia
Infiltrado Inflamatório	N/A	1,36±0,39	N/A	2,14±0,58	N/A	p=0,001
Células Adiposas	N/A	0,80±0,74	N/A	2,04±0,82	N/A	p=0,001

Nota: Valores são apresentados como média ± DP dos dados. Os resultados foram comparados por teste-*t* de Student. N/A = não avaliado.

As Figuras 13 e 14 ilustram a diferença da quantidade de inflamação (infiltrado inflamatório) e de células adiposas (gordura), respectivamente, entre os grupos 1 e 2.

Figura 13 – Diferença da quantidade de inflamação entre os grupos de estudo

Figura 14 – Diferença da quantidade de gordura entre os grupos de estudo

5.4. IHQ x HIS

Comparando-se as duas técnicas realizadas, a Imunohistoquímica e a Hibridização *in situ*, nas amostras do Grupo 1 e do Grupo 2, verificaram-se diferenças significativas entre as técnicas desenvolvidas descritas na Tabela 22 e relatadas adiante:

- No grupo das aortas ascendentes (G1), a única diferença significativa foi em relação à quantidade de CP na camada adventícia ($p=0,018$), sua quantidade foi maior na Imunohistoquímica;
- Dentro do Grupo 2 (aneurismas aórticos), houve diferença significativa com respeito à quantidade de MP, íntima, sua quantidade foi maior na IHQ ($p=0,004$). Para CP, constatou-se diferença significativa tanto na íntima ($p=0,010$) quanto na adventícia ($p=0,001$), sua presença foi maior na reação de IHQ;
- Analisando os TLRs, não se observou diferença significativa para o TLR4, contudo, para o TLR2 notou-se diferença significativa na íntima ($p=0,020$), sua quantidade foi maior nas camadas íntimas das amostras analisadas pela reação de HIS.

Tabela 22 – Comparação entre as técnicas de Imunohistoquímica e Hibridização *in situ*, nos grupos analisados

Genes	Grupos	IHQ x HIS			
		G1		G2	
		Íntima	Adventícia	Íntima	Adventícia
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>		0,867	0,358	0,004	0,076
<i>Chlamydia pneumoniae</i>		0,170	0,018	0,010	0,001
TLR2		0,713	0,778	0,020	0,173
TLR4		0,743	0,952	0,201	0,228

Nota: Valores são apresentados como coeficientes de significância (p). Os resultados foram comparados por teste- t de Student

A Figura 15, a seguir, ilustra marcações nas camadas íntimas e adventícias, tanto pela técnica de Hibridização *in situ*, quanto pela técnica de Imunohistoquímica para pesquisa dos agentes infecciosos e dos TLRs de estudo. A positividade corresponde à coloração castanho-escuro, nos citoplasmas e núcleos das células.

Figura 15 - Fotomicrografia de fragmentos de aortas ascendentes e de aneurismas aórticos submetidos à técnica de Imunoperoxidase e de Hibrização *in situ*: (A) IHQ para antígenos de *C. pneumoniae* na camada adventícia (seta, 100X); (B) IHQ para antígenos de *M. pneumoniae*, camada adventícia (seta, 100X); (C) IHQ para antígeno de TLR2, infiltrado inflamatório na camada adventícia (seta, 400X) (D) IHQ para antígenos de TLR4, na camada íntima (seta, 200X); (E) HIS para *C. pneumoniae* na camada adventícia (seta, 100X); (F) HIS para *M. pneumoniae*, na camada adventícia (seta, 100X); (G) HIS para TLR2, na camada adventícia (seta, 400X) e (H) HIS para TLR4, na camada adventícia (seta, 400X).

5.5. Biologia Molecular

5.5.1. Estudo da expressão de mRNA dos receptores *Toll-like*

As amostras de tecido obtidas foram analisadas pela PCR em tempo real para detectar a expressão de mRNA de TLR2 e TLR4, através de uma quantificação relativa ao gene GAPDH.

O Grupo 1 foi constituído de 12 amostras de aortas ascendentes, uma amostra não apresentou cDNA suficiente para análise. O Grupo 2 foi constituído de 12 amostras de aneurismas aórticos, duas amostras não possuíam tecido congelado para extração de RNA.

Os resultados da expressão de mRNA de TLR2 e TLR4, nos grupos, foram calculados utilizando a fórmula: $2^{-\Delta Ct}$, onde $\Delta Ct = Ct \text{ amostra} - Ct \text{ controle endógeno}$.

A expressão de mRNA de TLR2 foi maior no Grupo 2 do que no Grupo 1, porém não houve diferença significativa ($p=0,426$). Enquanto que a expressão de mRNA de TLR4 apresentou quase a mesma em ambos os grupos, logo, não houve diferença significativa ($p=0,809$). Doravante, houve diferença significativa da expressão de TLR2 comparando-a com a expressão de TLR4 no Grupo 1 ($p=0,006$) (Tabela 23).

Tabela 23 – Análise descritiva para expressão de mRNA dos TLRs e comparação entre os grupos

Grupos das Amostras	G1 (aortas) N=12	G2 (aneurismas) N=12	G1 x G2
TLR2	0,359±0,32	0,602±0,99	p=0,426
TLR4	0,049±0,08	0,042±0,03	p=0,809
	p=0,006	p=0,076	

Nota: Valores são apresentados como média ± DP dos dados. Os resultados foram comparados por teste-*t* de Student.

As Figuras 16, 17, 18 e 19 ilustram a expressão de mRNA de TLR2 e a expressão de mRNA de TLR4 nos Grupos 1 e 2.

Figura 16 – Expressão de mRNA de TLR2 nos grupos de estudo

Figura 17 – Expressão de mRNA de TLR4 nos grupos de estudo

Figura 18 – Expressão de mRNA de TLR2 e TLR4 nos grupos de estudo, em gráfico de perfis de média, com dois erros-padrão

Figura 19 – Expressão de mRNA de TLR2 e TLR4 nos grupos de estudo, em dispersão

Não se observaram correlações significativas entre a expressão de mRNA de TLR2 com a expressão de mRNA de TLR4, nos grupos de estudo (Tabela 24).

Tabela 24 – Correlações entre os receptores *Toll-like* entre si nos diferentes grupos

Variáveis	r	p
Expressão de mRNA de TLR2- G1 x Expressão de mRNA de TLR2- G2	0,230	0,470
Expressão de mRNA de TLR2- G1 x Expressão de mRNA de TLR4- G1	0,244	0,443
Expressão de mRNA de TLR2- G1 x Expressão de mRNA de TLR4- G2	0,216	0,498
Expressão de mRNA de TLR2- G2 x Expressão de mRNA de TLR4- G1	-0,244	0,443
Expressão de mRNA de TLR2- G2 x Expressão de mRNA de TLR4- G2	0,174	0,586
Expressão de mRNA de TLR4- G1 x Expressão de mRNA de TLR4- G2	-0,048	0,879

Nota: r = Coeficiente de correlação de Spearman. TLR2 = *Toll-like receptor 2* e TLR4 = *Toll-like receptor 4*.

5.5.2. Estudo dos agentes infecciosos pela PCR em Tempo Real

As amostras de tecido obtidas foram analisadas pela PCR em tempo real para detectar DNA de *M. pneumoniae* e de *C. pneumoniae*, através de quantificação absoluta baseada em curvas-padrão (cópias/ μ L).

O Grupo 1 foi constituído de 13 amostras de aortas ascendentes. O Grupo 2 foi constituído de 11 amostras de aneurismas aórticos, três amostras não possuíam tecido congelado para extração de DNA.

Os resultados da PCR em tempo real para *M. pneumoniae* foram negativos, em todas as amostras e em todos os métodos de extração realizados.

A extração feita pelo Kit *DNeasy Tissue* (Qiagen, Colônia, Alemanha) foi realizada em todas as amostras (G1+G2), enquanto que as extrações feitas pelo Kit *QIAamp DNA* (Qiagen, Colônia, Alemanha) e pelos métodos Fenol/Clorofórmio, Triton e SDS foram utilizadas apenas nas amostras do Grupo 2 (aneurismas aórticos), porque todo o tecido congelado do Grupo 1 já havia sido extraído pelo kit *DNeasy Tissue* (Qiagen, Colônia, Alemanha).

A primeira extração de DNA realizada (Kit *DNeasy Tissue*) apresentou-se negativa para *C. pneumoniae* também. Sendo assim, realizou-se uma contraprova, para detectar se as amostras de DNA apresentavam inibidores da PCR.

Duas amostras foram escolhidas, aleatoriamente, e cada uma foi diluída (1:2 e 1:10). Foi adicionado conjuntamente ao DNA de estudo DNA do *M. pneumoniae* em cada amostra diluída, de acordo com o protocolo anteriormente otimizado.

Realizou-se a PCR em tempo real para pesquisa do *M. pneumoniae*, em duplicata, com controle positivo e outro negativo (substituição do DNA por água

miliQ). Houve amplificação comprovando que não há inibidores da PCR nas amostras de DNA analisadas (Figura 20).

Figura 20 – Contraprova da PCR em tempo real para o *M. pneumoniae* apresentando amplificação (curvas semi-logarítmicas) das amostras contendo DNA do *M. pneumoniae*

A segunda extração realizada (kit QIAamp DNA) apenas no grupo 2 (aneurismas) apresentou positividade de 100% (11/11) para *C. pneumoniae*.

A quantificação feita através da curva-padrão de 10^6 - 10^2 cópias/ μ L variou de 498,97 a 1.868,76 cópias/ μ L, com média de 1.121,50 cópias/ μ L nas amostras dos aneurismas aórticos (G2) (Figura 21).

Figura 21 – Pesquisa de *C. pneumoniae* nas amostras do grupo 2 (Kit QIAamp)

As extrações realizadas pelo Método Fenol/clorofórmio e pelo Método SDS apresentaram igual positividade de 45,45% (5/11) para *C. pneumoniae* (Figuras 22 e 23). A extração realizada pelo Método Triton, a positividade foi 18,18% (2/11) (Figura 24).

Figura 22 – Pesquisa de *C. pneumoniae* nas amostras do grupo 2 (Fenol/clorofórmio)

Figura 23 – Pesquisa de *C. pneumoniae* nas amostras do grupo 2 (SDS)

Figura 24 – Pesquisa de *C. pneumoniae* nas amostras do grupo 2 (Triton)

6 DISCUSSÃO

Desde os primeiros relatos sobre lesões ateroscleróticas e, principalmente, nos últimos trinta anos, avanços extraordinários foram obtidos referentes aos mecanismos celulares e moleculares da aterogênese. Esses avanços desenvolvem-se em paralelo ao crescimento da compreensão da Biologia Vascular, homeostase e metabolismo lipídico (LOSCALZO, 2005). A interação inflamação-infecção na aterogênese, também, é de fundamental importância para os avanços neste processo, o qual é complexo e multifatorial. O presente trabalho foi elaborado como coadjuvante na mestria do mecanismo da patogênese da aterosclerose.

A casuística obtida foi composta pelo Grupo 1, constituído de 13 fragmentos de aortas ascendentes, local onde a aterosclerose ocorre de forma menos acentuada. E, pelo Grupo 2, formado por 14 fragmentos de aneurismas de aortas torácicas ou abdominais.

Os Grupos 1 e 2 foram investigados pelas seguintes técnicas: Imunohistoquímica, Hibridização *in situ* e PCR em tempo real (SYBR Green®) para pesquisa de *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae* e receptores *Toll-like* (TLR2 e 4). Dessa maneira, foi possível investigar o sistema imune inato (representado pelos TLRs), cooperando com o sistema imune adquirido, este é o responsável pela resposta do organismo à presença dos agentes infecciosos, os quais contribuem para lesionar o endotélio vascular, no caso, de aortas ascendentes e aneurismas aórticos. Poucas pesquisas alusivas ao papel do MP na aterosclerose existem, ao contrário da CP. Igualmente, há pouco estudo pertinente à formação e progressão da aterosclerose em aneurismas na presença destes microorganismos.

Em relação aos TLRs, poucos trabalhos científicos contribuíram para desvendar o papel destes na aterosclerose presente em aneurisma, e, ainda mais, na presença de MP e CP.

6.1. *Chlamydia pneumoniae*

Infecções bacterianas, tais como: *C. pneumoniae*, *Helicobacter pylori* ou *Porphyromonas gingivalis*, podem desencadear a secreção de citocinas inflamatórias, conduzindo à aterogênese. Os mecanismos de reconhecimento destes patógenos, os quais poderiam iniciar a aterosclerose, permanecem desconhecidos (TRANTAFILOU et al., 2007).

Entre os anos de 1992 e 2000, mais de quarenta estudos foram publicados na detecção de *C. pneumoniae* em tecidos vasculares. As técnicas mais usadas foram a Imunohistoquímica e a PCR, mas também foi usada Microscopia Eletrônica, Cultura de Células, Imunofluorescência e Hibridização *in situ*. Estes estudos somaram 2.644 fragmentos ateroscleróticos de várias artérias humanas e algumas veias (BOMAN; HAMMERSCHLAG, 2002).

Porém, em aneurismas da aorta, poucos o fizeram para pesquisa de antígenos de *C. pneumoniae* (MAZUR et al., 2004; NYSTROM-ROSANDER et al., 2002; LOEHE et al., 2002; BERGER et al., 2000; HALME et al., 1999; JUVONEN et al., 1997).

a) *C. pneumoniae* e Imunohistoquímica

Estudos descreveram positividade (100%), para antígenos de *C. pneumoniae*, em válvulas aórticas divididas em grupos (normal, aterosclerótico, estenose preservada, estenose fibrótica e estenose calcificada), pela técnica de

Imunoperoxidase (PIERRI et al, 2006). Utilizando a mesma técnica, Kuo et al. (1993) pesquisaram em aortas, antígenos para *C. pneumoniae* (33%), enquanto que Juvonen et al. (1997), em aortas, detectaram positividade em todas as amostras. O presente estudo detectou no Grupo 1 (aortas) positividade de 100% para pesquisa de antígenos de *C. pneumoniae* por Imunoperoxidase.

Pires e Gutierrez (2007) analisaram aneurismas aórticos abdominais (AAA), pela técnica de Imunoperoxidase, constatando positividade em todas as amostras, incluindo o grupo controle (sem aneurisma). Mazur et al. (2004) detectaram positividade de 86,54%, para antígenos de *C. pneumoniae*, em AAA, pela técnica de Imunofluorescência *in situ*. Utilizando a técnica da Imunoperoxidase, Halme et al. (1999) estudaram aneurismas aórticos abdominais, obtendo positividade de 55%, para antígenos de *C. pneumoniae*.

O presente estudo detectou positividade de 100%, nos aneurismas aórticos (Grupo 2), mostrando resultados interessantes em relação à literatura. Não houve diferenças significativas na quantidade de CP comparando-se G1 e G2. Embora, no G2 verificou-se maior número de antígenos de CP na adventícia comparada à íntima ($p=0,040$). Houve correlação da quantidade de CP, na íntima, com o número de células adiposas ($r=0,575$ e $p=0,031$). Os resultados encontrados para pesquisa de antígenos de *C. pneumoniae* em lesões ateroscleróticas, seja moderada ou intensa, confirmam a predisposição desta bactéria para tecidos ateroscleróticos, principalmente na túnica adventícia, podendo contribuir com a progressão da aterosclerose.

b) *C. pneumoniae* e Hibridização *in situ*

A HIS mostrou positividade de 80% em aortas (G1) e de 71,42% em aneurismas aórticos (G2), para pesquisa de DNA de CP. Enquanto que, Lajunen et

al. (2008) observaram 39,4% em artérias carótidas, Shi e Tokunaga (2002a) evidenciaram positividade de 40% em aortas ateroscleróticas já positivas para o vírus da Herpes. Burian et al. (2001) detectaram positividade em aortas de camundongos, relatando exacerbação da lesão aterosclerótica nas co-infecções de CP e o Citomegalovírus (CMV).

Estudos relataram através da Imunocitoquímica, antígenos de CP (100%), em macrófagos situados em lesões ateroscleróticas avançadas, mas não em estrias gordurosas e em artérias normais. Através da HIS e PCR *in situ* as amostras foram negativas. E, empregando-se a técnica TUNEL, a positividade foi de 83,33%, concluindo que os antígenos de CP persistem nas lesões ateroscleróticas, mais do que o DNA e o fragmento 16S ribossomal (MEIJER et al., 2000a).

No presente estudo não foi constatada diferença significativa, empregando-se a HIS, entre a quantidade de CP do G1 com o G2. Porém, houve correlação entre a quantidade de CP na íntima com a mesma na adventícia ($r=0,585$ e $p=0,028$). Sendo assim, a carga infecciosa circulante nos vasos pode interferir na lesão aterosclerótica. O aumento de infiltrado inflamatório se eleva com o aumento de CP na íntima ($r=0,540$ e $p=0,046$), logo o sistema de defesa humano está prontamente vigilante à presença desta bactéria.

A quantidade de CP, na adventícia, pela reação de IHQ foi maior do que a quantidade de CP, na adventícia, pela reação de HIS ($p=0,018$ no G1 e $p=0,001$ no G2). Apenas no G2, a presença de CP na íntima pela IHQ foi maior do que pela reação de HIS ($p=0,010$). Para saber qual técnica foi mais específica para pesquisa de CP faz-se necessário a realização de testes de sensibilidade e especificidade para cada técnica.

Meijer et al. (2000b) compararam as técnicas de IHQ e HIS em cultura de

macrófagos e em pulmões de camundongos, ambos infectados por CP, observando que os antígenos de CP (IHQ) tiveram uma marcação tipo inclusão, próximas às marcações feitas pela HIS, tanto da sonda de DNA de CP, quanto pela sonda baseada no 16S ribossomal da CP, estas marcações sugerem uma bactéria viável. Enquanto que as marcações feitas pela IHQ nos locais onde não foi marcado pela HIS, sugere uma bactéria não viável. Concluindo que os métodos de detecção *in situ* são adequados para avaliar a viabilidade dessa bactéria.

c) *C. pneumoniae* e PCR em tempo real

As amostras foram extraídas duas vezes: a primeira pelo Kit *DNeasy Tissue*, apresentando resultado negativo para todas e a segunda vez pelo Kit *QIAamp DNA*, apresentando positividade de 100%. Portanto, para pesquisa de DNA bacteriano em tecidos de aneurismas aórticos recomenda-se o Kit *QIAamp DNA*. Outros testes de extração foram realizados, mas apresentaram baixa positividade, pois a amostra extraída era o filtrado de uma extração anterior (Item 3.6 e 5.5.2).

Sodeck et al. (2004), através da PCR em tempo real, sistema Taqman, analisou-se 148 tecidos com dissecação da aorta, aneurismas torácicos e abdominais, para detecção de CP. A extração dos tecidos foi feita pelo kit da QIAGEN. Todos foram negativos para CP e para *C. psittaci*, e 1 positivo (1/65) para *C. trachomatis*. Não houve diferenças entre os grupos de estudo com o grupo controle.

Wang et al. (2007) analisaram 269 amostras sanguíneas de portadores de doenças arterio-coronarianas (DAC) e concluíram que a presença do DNA de CP, circulante nos vasos, possui associação com o avanço da doença, contribuindo com a progressão da aterosclerose coronariana.

Kozarov et al. (2006) analisaram 129 placas de ateroma para pesquisa de

dez espécies de microorganismos, através da técnica de PCR em tempo real, utilizando o sistema SYBR Green, detectando positividade de, aproximadamente, 50% de CP e de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (A.a.), porém concluíram que a quantidade de CP em proporção ao DNA total foi mínima.

Estudos analisaram aortas ascendentes de pacientes com doenças coronarianas e revelaram positividade de 30% para CP, pela PCR em tempo real e 50% pela PCR *nested* (NYSTRÖM-ROSANDER et al., 2006). Pesquisas em biópsias de artérias torácicas internas demonstraram positividade de 15,15% para CP, pela PCR em tempo real (IRIZ et al., 2007). Outros estudos, em placas ateroscleróticas de carótidas, detectaram positividade de 36,66% para CP e demonstraram que a quantificação em células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMC) é melhor para avaliar a infecção clamidial (SESSA et al., 2007). Por outro lado, outras pesquisas não detectaram positividade de CP, em PBMC, de pacientes com carótidas ateroscleróticas ecolucentes ou ecogênicas (HALVORSEN et al., 2007).

Gueinzius et al. (2007) demonstraram que o contínuo estresse laminar em culturas de células podem diminuir a infecção de CP. Talvez por isso esta bactéria prefira a camada adventícia do que a íntima, para evitar o atrito do fluxo sanguíneo nessa camada. E, talvez por esse motivo, não houve diferença significativa da quantidade de CP entre os Grupos G1 e G2, pois Gueinzius et al. (2007) constataram que o estresse sanguíneo não afeta a transmissão de CP, apenas diminui a formação de inclusões desta e sabe-se que o G1 (aortas ascendentes) sofreu menor estresse sanguíneo que o G2, aneurismas aórticos, com lúmen diminuído pela formação de placas de ateroma, ocasionando maior estresse no fluxo sanguíneo.

Hoymans et al. (2004) analisaram 197 fragmentos arteriais pela técnica de

PCR (convencional e em tempo real) e todas foram negativas. Além disso, empregaram outras técnicas como *Western Blotting*, Imunohistoquímica, Microscopia fluorescente UV e Fixação Histológica, concluindo que a positividade presente na IHQ correspondia aos depósitos ceroidais autofluorescentes. A alta prevalência de CP nas amostras do estudo presente, pela técnica da IHQ, pode ser devido a esta reação não-específica dos anticorpos anti-clamidia com alguns constituintes das placas de ateroma.

6.2 *Mycoplasma pneumoniae*

Pickens e Catterall (1978) afirmam que a primeira associação do *M. pneumoniae* com doenças cardiovasculares foi descrita em 1944, por Finkelstein e Klainer. Os primeiros pesquisadores relatam um caso de um paciente com infecção provocada por MP apresentando complicações como miocardite e coagulação intravascular disseminada, esta última já foi descrita conjuntamente às infecções bacterianas e virais, porém sua ocorrência em infecções por MP é raro.

A análise genômica de *M. pneumoniae* revelou a existência de um grande número de genes de lipoproteínas comparados a outras bactérias. Contudo, o papel patogênico das lipoproteínas do MP ainda é desconhecido (INTO et al., 2007).

a) *M. pneumoniae* e Imunohistoquímica

O presente trabalho mostrou, pela técnica de Imunoperoxidase, positividade de 100% em aortas ateroscleróticas e em aneurismas aórticos. Nenhuma pesquisa correlata foi encontrada. De acordo com esses dados, pode-se afirmar que este agente infeccioso está presente, entretanto, vários estudos serão necessários para analisar o papel real dele na aterosclerose.

Houve uma quantidade maior de antígenos de MP no G2 (aneurismas), do que no G1 (aortas) na íntima ($p=0,012$), sugerindo uma propensão à lesões ateroscleróticas.

b) *M. pneumoniae* e Hibridização *in situ*

Em relação à pesquisa de DNA de *M. pneumoniae* pela HIS, o Grupo 1 apresentou 80% de positividade e no Grupo 2 foi de 85,71%. Esta diferença não foi significativa, mas reflete a preferência do MP aos locais com maior quantidade de gordura, pois é uma bactéria que se nutre de colesterol e o G2 apresentou maior quantidade de células adiposas do que o G1 ($p=0,001$).

Houve correlação entre o DNA de MP presente na íntima com o DNA de MP na adventícia, apenas no grupo dos aneurismas ($p=0,005$ e $r=0,708$). Isto leva a interpretar que se há maior quantidade de MP adentrando pela íntima (células endoteliais) nas artérias, sua preferência será onde possui maior número de células adiposas, portanto, na túnica adventícia, equilibrando sua concentração nas camadas.

Por conseguinte, não houve diferença significativa entre as camadas íntimas e adventícias em cada grupo. Isto sugere que no G1 como há pouca gordura na íntima quanto na adventícia, tanto faz para o MP; enquanto que no G2 a quantidade de gordura na íntima, deve-se à presença da placa de ateroma que se equilibra com a gordura presente na adventícia.

Pires e Gutierrez (2007) analisaram aneurismas aórticos abdominais (AAA) e um grupo controle sem aneurisma, mas com aterosclerose, constatando positividade de MP pela técnica de HIS, em todos os grupos, sem diferenças significativas entre os grupos.

Pesquisas de DNA de MP foram feitas em válvulas aórticas com estenose mostrando positividade nos grupos: normal, aterosclerose, estenose preservada, estenose fibrótica e estenose calcificada, sugerindo co-infecção MP e CP no processo da inflamação e calcificação das aortas (HIGUCHI-DOS-SANTOS et al., 2005).

Poucos estudos foram realizados apresentando à área científica a presença deste patógeno em lesões ateroscleróticas, sugerindo participação no desenvolvimento e agravamento das lesões ateroscleróticas (HIGUCHI et al., 2006; HIGUCHI et al., 2003; HIGUCHI et al., 2002; HIGUCHI, 2000).

Sabe-se que a aterosclerose é uma doença inflamatória. Hipóteses surgiram em relação à aterosclerose ser, também, uma doença infecciosa partindo da constatação da presença de *C. pneumoniae*, Citomegalovírus, Herpes simples e *Helicobacter pylori* em placas de ateroma (SANTOS, 2003; SHI; TOKUNAGA, 2002a, 2002b; BLOEMENKAMP et al., 2002); e pelo fato de pacientes portadores de doenças arterio-coronarianas apresentarem sorologia alta ou significativa para tais patógenos. Nessa mesma linha de raciocínio, a presença de *M. pneumoniae* em lesões ateroscleróticas sugere a participação dele na aterosclerose.

No presente estudo, verificou-se no grupo dos aneurismas diferença significativamente maior na quantidade de MP na íntima pela IHQ, do que pela técnica de HIS ($p=0,004$). Mais estudos serão necessários para comprovar se existem reações não-específicas pela IHQ.

c) *M. pneumoniae* e PCR em tempo real

Templeton et al. (2003) compararam o método sorológico com a PCR em tempo real (iCycler IQ da BioRad), para pesquisa de *M. pneumoniae* em amostras de pacientes com infecção no trato respiratório. Concluíram que os métodos

moleculares são melhores no diagnóstico desse agente infeccioso, oferecendo menor tempo no diagnóstico e de execução.

Pela PCR em tempo real, as amostras do Grupo 1 e do Grupo 2 foram negativas para pesquisa de *M. pneumoniae* com extração feita pelo Kit *DNeasy Tissue*. Pela extração feita com o Kit *QIAamp DNA*, as amostras do G2 foram novamente negativas, não sendo compatíveis com os resultados da Imunohistoquímica e Hibridização *in situ*. Com o resultado da contraprova, retirou-se a dúvida da presença de inibidores da PCR na primeira extração realizada e na segunda extração houve positividade de CP, comprovando a ausência de inibidores da PCR nas amostras extraídas. A revisão de literatura mostrou que a maioria dos *kits* empregados neste estudo também são empregados por outros pesquisadores para detectar MP, mas, principalmente, em amostras respiratórias (bronco-alveolares/ BALs).

A PCR convencional é mais recomendada para diagnósticos clínicos de *M. pneumoniae*, pois é mais sensível do que as técnicas de detecção de antígenos. (WAITES; TALKINGTON, 2004). Por conseguinte, a técnica da PCR em tempo real deve ser mais aconselhada, porque é mais sensível, mais específica e de maior reprodutibilidade comparada à PCR convencional. Não foi encontrada pesquisa similar pela técnica de PCR em tempo real, usando sistema SYBR Green®.

Iriz et al. (2007) analisaram biópsias aórticas sem placas de ateroma visíveis e biópsias de artérias torácicas internas para pesquisas de DNA de MP, pela PCR em tempo real, e não detectaram positividade, apenas para pesquisa de CP.

Através da PCR convencional, empregando Kit de extração *QIAamp DNA*, em amostras arteriais de portadores de doenças cardíacas, constatou-se positividade de 2,5% em amostras de coronárias e de 3% em amostras de válvulas

cardíacas. Fizeram uma contraprova e não havia inibidores de PCR nas amostras de DNA, concluindo que o MP não é um importante fator para o desenvolvimento de doenças vasculares (MARAH et al., 2000).

O *M. pneumoniae* é um dos menores e mais simples procariotos, não possuindo membrana celular e com genoma bem reduzido (580~2.200 kb). O tamanho e volume reduzido permitem atravessar filtros porosos de 0,45 µm de diâmetro. Sua massa celular não permite detecção através do microscópio óptico e não produz turbidez em líquido (WAITES; TALKINGTON, 2004). Por conseguinte, esta bactéria seria capaz de ser extraída pelos *Kits* empregados neste estudo, os quais usam a cromatografia de afinidade em membrana sílica? O *M. pneumoniae* seria destruído por estas extrações ou atravessaria os filtros da membrana nas primeiras centrifugações, nas quais o filtrado é descartado?

Testes denominados de Método Fenol/clorofórmio, Método SDS e Método Triton foram feitos usando os filtrados, os quais seriam desprezados mediante a norma de utilização do *Kit QIAamp DNA*. O procedimento da metodologia está descrito no item 3.6. Contudo, essas amostras foram novamente negativas pela PCR em tempo real para pesquisas de MP, sendo que a minoria apresentou positividade para CP. Talvez se tivessem sido re-extraídas pelo *kit* apresentariam positividade para MP?

Compararam a extração de ácidos nucleicos de CP e MP através de diferentes extrações: *kit QIAamp DNA Blood* (QIAGEN, Alemanha), *NucliSens miniMAG* (BioMérieux, Holanda) e *NucliSens EasyQ* (BioMérieux, Holanda). O último foi considerado mais fácil de executar e com alto desempenho associado à amplificação pelo *NucliSens EasyQ NASBA*, em amostras respiratórias de pacientes hospitalizados com pneumonia (LOENS et al., 2007).

Loens et al. (2008) demonstraram que a técnica *Simplex real time nucleic acid sequence-based amplification* (RT-NASBA) é mais sensível do que a *Multiplex* RT-NASBA e do que a PCR simples, para detectar MP e *L. pneumophila* em amostras respiratórias.

6.3. Co-infecção *C. pneumoniae* e *M. pneumoniae*

Higuchi (2000) relatou a primeira associação de *C. pneumoniae* e *M. pneumoniae* em ateromas trombóticos, através da técnica de Hibridização *in situ* e Microscopia Eletrônica, em pacientes que foram a óbito por infarto agudo do miocárdio. Os micoplasmas estavam presentes principalmente, no centro lipídico e são os únicos microorganismos que necessitam de colesterol para sobreviver, como já mencionado.

Pela técnica de Imunohistoquímica (identificação de antígenos de *C. pneumoniae*) e pela Hibridização *in situ* (detecção de DNA de *M. pneumoniae*), em válvulas aórticas com estenose foi abordada a co-infecção de *C. pneumoniae* e *M. pneumoniae*, a presença desses microorganismos foi maior nas áreas degeneradas do que nas áreas mais preservadas das válvulas (HIGUCHI-DOS-SANTOS et al., 2005).

No presente estudo, através da Imunoperoxidase, detectou-se positividade (100%) de ambos os patógenos nos dois grupos analisados, não houve diferença na quantidade deles. Além disso, no Grupo 1 (aortas) houve correlação do aumento da quantidade de *C. pneumoniae* com o aumento da quantidade de *M. pneumoniae* na camada íntima ($r=0,810$ e $p=0,003$), sugerindo uma co-infecção de

C. pneumoniae e *M. pneumoniae*.

Através da HIS, não houve diferenças significativas na quantidade de DNA dos agentes infecciosos, em cada grupo. Todavia, houve correlação do aumento da quantidade de *C. pneumoniae* com o aumento da quantidade de *M. pneumoniae* tanto na camada íntima ($r=0,557$ e $p=0,038$), quanto na adventícia ($r=0,620$ e $p=0,016$), sugerindo uma co-infecção de *C. pneumoniae* e *M. pneumoniae*, assim como pela IHQ.

Higuchi et al. (2006) analisaram e compararam as diferenças de ateromas estáveis humanos (em início de formação) com ateromas mais avançados, pela Imunoperoxidase. Como resultados obtiveram positividade (100%), em todas as amostras para os agentes infecciosos abordados. O grupo dos ateromas em fase inicial apresentou distribuição normal de macrófagos, quantidade de *C. pneumoniae* e quantidade de linfócitos menores do que o grupo dos ateromas em fase mais avançada. A quantidade de *M. pneumoniae* foi alta em ambos os grupos, estando relacionado a todos os tipos de lesões ateroscleróticas. Detectaram, também, correlação de *C. pneumoniae* e *M. pneumoniae* e deste com fatores de crescimento do endotélio arterial. Logo, os agentes infecciosos devem participar na modulação da resposta imune do hospedeiro, sendo fundamentais na progressão e na estabilização da placa de ateroma. Estes resultados são coincidentes com o presente trabalho.

6.4. Receptores *Toll-like*

Funcionalmente, os TLRs alertam o sistema imune para a presença de microorganismos estranhos ao organismo do hospedeiro. Em conjunto com seus

ligantes, endógenos ou exógenos, lideram a produção de citocinas inflamatórias, quimiocinas e moléculas efetoras (adaptadoras) dependendo do tipo de TLR que é ativado (ARMANT; FENTON, 2002).

A aterosclerose é uma resposta inflamatória crônica, caracterizada pelo acúmulo de células no interior das artérias, oriundas do sistema imune inato e adquirido. Os membros da família TLR desempenham um papel crítico na resposta inflamatória da aterosclerose. *Chlamydia* sp. e *Porphyromonas* sp. certamente possuem ligantes para TLR2 e TLR4 (TOBIAS; CURTIS, 2005).

a) Receptores *Toll-like* e Imunohistoquímica

Através da técnica de Imunoperoxidase, identificaram-se antígenos para TLR2 e TLR4 com positividade de 100%, no Grupo 1 (aortas) e no Grupo 2 (aneurismas). Não houve diferença significativa comparando-se a quantidade de TLR2 entre os grupos, mas o TLR4 apresentou maior quantidade no G2, tanto na íntima ($p=0,017$), quanto na adventícia ($p=0,017$). Comparando-se os TLRs, foi observado que o número de antígenos de TLR4 é maior do que de TLR2, apenas na íntima do G2 ($p=0,003$), sugestionando que o TLR4 apresenta propensão às lesões ateroscleróticas.

O estudo de De Graaf et al. (2006) analisou células musculares lisas de enxertos venosos detectando TLR2 e TLR4 pela técnica de Imunohistoquímica e sua co-localização com HSP60 humana, mas não em veias normais. No estudo de Xu et al. (2001) não foi detectado expressão de TLR2 em aortas com lesões ateroscleróticas humanas e de camundongos, através da Imunohistoquímica, somente de TLR4. Enquanto que Ward et al. (2005) analisaram, por Citometria de fluxo e por IHQ, a associação dos TLR2 e 4 na ativação das plaquetas e concluíram que não possuem uma função direta nesse processo, podendo ser indireta ou

através de outros agonistas de TLRs não estudados por eles.

De acordo com as correlações existentes no Grupo 1, se houver aumento de antígenos de TLR2 na íntima, aumenta os seus antígenos presentes na adventícia ($r=1$ e $p<0,001$) e o mesmo ocorre para o TLR4 ($r=0,687$ e $p=0,041$). O Grupo 2 apresentou a mesma correlação com o TLR4, se aumentar na íntima aumenta na adventícia também ($r=0,713$ e $p=0,004$), ainda houve correlação de TLR4 íntima, com TLR2 adventícia ($r=0,569$ e $p=0,034$), sugerindo que a ativação dos receptores é similar, possuindo algum ligante em comum, endógeno e/ou exógeno.

A experiência realizada por Shishido et al. (2003) mostrou que o TLR2 tem importante função no remodelamento ventricular, após infarto do miocárdio induzido em camundongos.

Vários TLRs (incluindo TLR1, TLR2, TLR4 e TLR5) são expressos em placas ateroscleróticas por vários tipos celulares e leucócitos (DOHERTY et al., 2006).

b) Receptores *Toll-like* e Hibridização *in situ*

Através da técnica de Hibridização *in situ* analisou-se TLR2 e TLR4 no Grupo 1 (aortas) com positividade de 100% para ambos e no Grupo 2 (aneurisma) a positividade foi de 92,85% (TLR2) e 100% (TLR4). Primeira controvérsia na técnica da HIS, o grupo com aterosclerose mais acentuada, com maior quantidade de infiltrado inflamatório ($p=0,001$), apresentou menor positividade de TLR2.

Nenhum estudo foi encontrado relacionando TLR2 e TLR4, pela técnica de HIS em aortas e em aneurismas aórticos, mas em mucosas nasais (YANG, et al., 2006; DONG et al. 2005; WANG; DONG, 2003), em macrófagos pulmonares humanos (DROEMANN et al., 2003) e em células epiteliais biliares (IKEDA et al.,

2007).

A quantidade de mRNA de TLR2, íntima, no G2 foi maior do que no G1 ($p=0,042$). No G1, foi presenciado correlação entre a quantidade de TLR2 com a quantidade de TLR4, na íntima ($r=0,761$ e $p=0,011$).

No G2, verificou-se correlação do TLR2 na camada íntima com a camada adventícia ($r=0,758$ e $p = 0,002$). Com TLR4 constatou-se o mesmo, aumento proporcional na camada íntima com a adventícia ($p=0,021$). Observou-se correlação entre o aumento da quantidade de infiltrado inflamatório com aumento da quantidade de TLR4, na camada íntima ($r=0,561$ e $p=0,037$). Estes resultados estão em concordância, com o fato de que os TLRs modulam o sistema imune inato, ativando o sistema imune adquirido para obtenção de uma resposta a um patógeno (O'NEILL, 2006a, 2006b, 2006c). Entretanto, houve uma correlação negativa de TLR2 com o grau de inflamação no G1 ($r=-0,700$ e $p=0,036$), dissonando da literatura científica, sendo a segunda controvérsia da reação de HIS.

Ainda no G2, existiram correlações de mRNA de TLR2 com o mRNA de TLR4, na íntima ($r=0,719$ e $p=0,004$). Como também de TLR2 na íntima com TLR4 na adventícia ($r=0,619$ e $p=0,018$). Isto sugere que a ativação dos receptores está uniforme e igual, resultado semelhante ao da reação de IHQ.

Estudo sobre os efeitos do fluxo sanguíneo e seu estresse no endotélio arterial mostrou que a expressão de TLR2 foi inibida quando submetida a um forte estresse sanguíneo, enfatizando que tal fato deve ser importante para o desenvolvimento da aterosclerose (DUNZENDORFER et al., 2004).

Laflamme et al. (2003) demonstraram a cooperação existente entre o TLR2 e TLR4, no cérebro de camundongos. Enquanto o TLR4 é absolutamente necessário para iniciar a resposta imune inata, o TLR2 participa na regulação dos

genes TNF- α e IL-12, sendo determinante para a transferência do sistema imune inato para o adaptativo.

A comparação entre as técnicas IHQ e HIS para pesquisa de TLRs nos grupos apresentou uma diferença significativa em relação ao TLR2 na íntima, sua quantidade foi menor na IHQ do que na íntima das amostras analisadas por HIS ($p=0,020$). As comparações entre as técnicas só poderão ser conclusivas quando existirem ensaios monitorizados para averiguar a sensibilidade e especificidade para pesquisa de cada gene de interesse neste estudo.

c) Receptores *Toll-like* e PCR em tempo real

A expressão de mRNA de TLR2 e de TLR4, através da PCR em tempo real, sistema SYBR Green, ocorreu em todas as amostras (G1 e G2).

Não houve diferenças significativas entre os grupos G1 e G2, para ambos os TLRs. Porém, há maior expressão de TLR2 comparando-se com a expressão de TLR4 no grupo das aortas ($p=0,006$). Não existiram correlações pertinentes aos TLRs nos grupos analisados, discordando das outras técnicas empregadas.

Nenhum trabalho foi encontrado empregando a PCR em tempo real (SYBR Green), para analisar a expressão de TLR2 e TLR4 em aneurismas e aortas ascendentes, tampouco em associação com CP e MP.

Outro estudo avaliou artérias normais e com placas de ateroma, pela técnica da PCR semiquantitativa e Imunohistoquímica, concluindo que há um aumento da expressão de TLR1, TLR2 e TLR4 em placas ateroscleróticas humanas (EDFELDT et al., 2002).

Li et al. (2007) demonstraram através da PCR em tempo real, Citometria de fluxo, Imunofluorescência e *Western Blotting* que o TLR4 está presente em

células musculares lisas vasculares aórticas humanas (HASMCs) e sua expressão é regulada pela liberação do LPS, dependendo da dose e duração.

Pela PCR em tempo real e Imunofluorescência confocal, foram detectados TLR1, 2, 4, 7 e 8 em tecidos adiposos. O TLR4 foi o mais expresso. Todos apresentaram co-localização com o NF-kappa B (VITSEVA et al., 2008).

Através da PCR em tempo real e da HIS, constatou-se a presença de TLRs (2, 3, 4 e 9) no endométrio humano, suas concentrações foram maiores durante os períodos pré-menstruais e baixos nos períodos pré-ovulatórios (HIRATA et al., 2007).

Uma pesquisa, através da PCR em tempo real, mostrou que não há diferença na expressão de TLR2 e TLR4 com a expressão do *receptor of advanced glycation endproduct* (RAGE), em camundongos RAGE-/- e em normais. Este último receptor possui papel na patogênese da aterosclerose, disfunção endotelial e inflamação vascular (HARJA et al., 2008).

As células endoteliais humanas da pele estão bem guarnecidas para o reconhecimento de PAMPs, pois representam o único tipo celular que expressa todos os tipos de TLRs atualmente conhecidos, analisado por PCR em tempo real, sistema SYBR Green (FITZNER et al., 2008). Izadi et al. (2007) demonstraram a cooperação do TLR1 e 2 na resposta a *Borrelia burgdorferi* pela técnica de PCR em tempo real (SYBR Green), em macrófagos de camundongo.

No trabalho de Saito et al. (2005), os dados encontrados através da IHQ, PCR *in situ*, *Western Blotting* e RT-PCR, sugeriram que o epitélio bronquial e macrófagos possuem um papel fundamental na injúria provocada pelo LPS no pulmão, mecanismo desencadeado via TLR2 e 4. No início da ação do LPS, os

TLRs aumentaram rapidamente e depois de 24 horas diminuíram a sua expressão gradualmente.

d) Receptores *Toll-like* e Agentes infecciosos

Não foram observadas correlações significativas entre TLRs e patógenos pela IHQ.

Pela HIS, foram observadas correlações positivas e significativas do MP (adventícia) apenas com TLR4 na íntima ($p=0,022$) e na adventícia ($p=0,010$) do G2. Este resultado é compatível ao fato do TLR4 ser um receptor de bactérias gram-negativas, logo o MP ativou a sinalização do TLR4. O MP possui uma característica peculiar: ausência da parede celular, porém, filogeneticamente é considerado gram-negativo.

Chu et al. (2005) demonstraram em pulmões de camundongos e em células epiteliais pulmonares humanas, ambos infectados por MP, que esta bactéria induz ao aumento de mucinas respiratórias, as quais dependem da ativação da sinalização do TLR2, através da técnica PCR em tempo real.

Poucas lipoproteínas de MP possuem forte atividade imunoestimulatória, a maioria possui fraca ou nenhuma atividade. Este fato é muito importante para a patogenicidade do MP, motivo pelo qual esta bactéria pode evadir-se do reconhecimento do TLR2. Porém, serão necessárias mais investigações em relação às funções e atividades das lipoproteínas do MP, para comprovar tal fato (INTO et al., 2007).

Shimizu, Kida e Kuwano (2007) demonstraram através da PCR em tempo real, que lipoproteínas triaciladas oriundas do MP ativam o NF-kappa B através de TLR1 e TLR2, mas não do TLR6.

Em estudos recentes, pela PCR em tempo real e Citometria de fluxo, foi observado que a interrupção da sinalização do TLR2 induzida pela infecção de *M. pneumoniae*, através da liberação de IL-4 e IL-13 (citocinas alérgicas), diminuiu a depuração do MP em pulmões de camundongo, deixando-o mais suscetível a doenças bacterianas (WU et al, 2007).

Outrossim, pela HIS, obtiveram-se correlações positivas e significativas de CP versus TLR2 no grupo dos aneurismas em três momentos, a saber:

- CP, íntima, com TLR2, íntima ($r=0,563$ e $p=0,036$);
- CP, adventícia, com TLR2 na íntima ($r=0,733$ e $p=0,003$) e na adventícia ($r=0,576$ e $p=0,031$).

Apesar da *C. pneumoniae* ser uma bactéria gram-negativa, ocorreu uma hiperativação do receptor *Toll-like 2*, conhecido receptor de bactérias gram-positivas. Sendo assim, essa bactéria possui algum ligante que desencadeia a sinalização do TLR2.

Embora *Haemophilus influenza* seja uma bactéria gram-negativa, acredita-se que expressa moléculas ativadoras não apenas de TLR4, mas também de TLR2 (MOON et al., 2007).

A ativação de TLR4 pela CP é sugerida pelas correlações ocorridas pela técnica de HIS:

- No Grupo das aortas, na camada adventícia ($r=0,730$ e $p=0,040$);
- No Grupo dos aneurismas, CP na íntima com TLR4 na adventícia ($r=0,589$ e $p=0,027$), como também, CP adventícia com TLR4 na íntima ($r=0,582$ e $p=0,029$).

A abordagem realizada por Prebeck et al. (2001) demonstra que a bactéria gram-negativa, *C. pneumoniae*, depende principalmente de TLR2 e em uma

extensão menor de TLR4.

Nos experimentos em pulmão, através da PCR em tempo real, foi demonstrado que camundongos TLR2^{-/-} e TLR4^{-/-} não apresentaram diferenças de depuração (clearance) da CP e na resposta sorológica comparados ao controle selvagem, concluindo que TLR2 e TLR4 não são importantes para o desenvolvimento de anticorpos e na eliminação de *C.pneumoniae* (MUELLER et al. 2004).

Através da Citometria de fluxo e da RT-PCR, constatou-se que a CP e a HSP60 clamidial são potentes indutores da proliferação de células musculares lisas vasculares (VSMC) *in vitro* e estes efeitos são modulados, pelo menos em parte, por uma ativação mediada por TLR4, do p44/p42 *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) (SASU et al, 2001).

Loh, Brodiziak e Blaut (2008) avaliaram a associação dos TLR2 e TLR4 com a microbiota intestinal e não detectaram impacto destes receptores com os microorganismos intestinais, através da Hibridização *in situ* fluorescente (FISH). Por outro lado, um estudo em células epiteliais biliares demonstrou que os TLR2 e 4 são ativados por componentes bacterianos, aumentando a expressão de fatores de transcrição intestinais, através da IHQ e HIS (IKEDA et al., 2007).

Foi demonstrado que tanto VSMCs de humano quanto de rato expressam TLR4, eficientemente, e a exposição ao LPS de *E.coli* promoveu um fenótipo de VSMC pró-inflamatório pela ativação da sinalização do TLR4. Observaram também que SMCs de coronárias humanas expressam TLR2 quando expostas a produtos microbianos da *C. pneumoniae* em estágios iniciais da aterogênese (YANG X et al., 2005).

Nos dois grupos de estudo, G1 e G2, houve presença de CP comprovado

através das técnicas de IHQ e HIS, enquanto que o G2 foi comprovado também pela PCR em tempo real. Talvez a presença de CP seja o motivo dos grupos, G1 e G2, não apresentarem diferenças de expressão de TLR2 e de TLR4 pela PCR em tempo real.

Esses resultados aumentam a importância da seguinte hipótese: a ativação de TLR2 e TLR4 por múltiplos antígenos microbianos podem contribuir para a progressão da aterosclerose e para os riscos de morte precoce? A patogênese da aterosclerose e suas complicações estariam, então, associadas com a carga infecciosa ou com a quantidade de patógenos nos pacientes (ESPINOLA-KLEIN et al., 2002).

7 RESUMO GERAL

A análise baseada na técnica de Imunohistoquímica estabeleceu o seguinte:

- *C. pneumoniae*, *M. pneumoniae*, TLR2 e TLR4 estão presentes em lesões iniciais ateroscleróticas nas camadas, íntima e adventícia, das aortas ascendentes.
- *C. pneumoniae*, *M. pneumoniae*, TLR2 e TLR4 estão presentes em aneurismas aórticos nas camadas íntimas e adventícias.
- Constatou-se o predomínio de antígenos de *M. pneumoniae* em aneurismas aórticos na camada íntima.
- Observou-se o predomínio de TLR4, tanto na camada íntima quanto na adventícia, dos aneurismas aórticos.
- Aumento simultâneo do número de *C. pneumoniae* e do número de *M. pneumoniae*, na camada íntima da aorta, o que sugere interação entre estes agentes infecciosos.
- Aumento simultâneo da quantidade de TLR2, na adventícia, com a quantidade de TLR4, na camada íntima nos aneurismas aórticos, sugerindo possuírem um ativador em comum.
- Aumento concomitante do grau da inflamação com a quantidade de células adiposas nas aortas.

A análise fundamentada pela Hibridização *in situ* estabeleceu o seguinte:

- *C. pneumoniae*, *M. pneumoniae*, TLR2 e TLR4 estão presentes em lesões iniciais ateroscleróticas nas camadas, íntima e adventícia, das aortas ascendentes.

- *C. pneumoniae*, *M. pneumoniae*, TLR2 e TLR4 estão presentes em aneurismas aórticos nas camadas íntimas e adventícias.
- Aumento coincidente do número de *C. pneumoniae* e do número de *M. pneumoniae*, na camada íntima e adventícia do aneurisma, o que sugere interação entre esses agentes infecciosos.
- Aumento simultâneo da quantidade de *M. pneumoniae*, na íntima, com a expressão de TLR4, na íntima e adventícia no aneurisma, sugestionando que este patógeno ativa a sinalização de TLR4, e não de TLR2.
- Aumento concomitante da quantidade de *C. pneumoniae*, íntima e adventícia, com a expressão de TLR2, íntima e adventícia no aneurisma, sugestionando que este patógeno ativa a sinalização de TLR2.
- Aumento simultâneo da quantidade de *C. pneumoniae* com a expressão de TLR4, na aorta e no aneurisma, sugestionando que este patógeno ativa a sinalização de TLR4, como também de TLR2.
- Aumento simultâneo da expressão de TLR2 com a expressão de TLR4, na aorta e no aneurisma, sugestionando que estes TLRs possuem o ativador (ligante) em comum de suas respectivas cascatas de sinalização.
- Aumento concomitante do grau de inflamação com a quantidade de células adiposas nas aortas, efeito similar à técnica de Imunohistoquímica.

Maior quantidade de infiltrado inflamatório e de tecido gorduroso foi observada em aneurismas aórticos, ratificando a diferença do grau de aterosclerose

entre os grupos estudados.

A análise determinada pela PCR em tempo real, sistema *SYBR Green*®, foi a seguinte:

- O DNA de *M. pneumoniae* não foi encontrado nas aortas e aneurismas aórticos estudados.
- O DNA de *C. pneumoniae* foi encontrado em aneurismas aórticos.
- Houve expressão de mRNA de TLR2 e TLR4 em aortas ascendentes e em aneurismas aórticos.
- Não houve diferença significativa da expressão de mRNA de TLR2 entre os grupos de estudo, como também não houve diferença significativa da expressão de mRNA de TLR4 (G1 x G2).
- A expressão de mRNA de TLR2 foi maior do que a expressão de mRNA de TLR4 na aterosclerose leve, representada pelas aortas ascendentes.

8 CONCLUSÕES

Presença de uma associação entre *Chlamydia pneumoniae* e *Mycoplasma pneumoniae*. Estes agentes infecciosos ativam o receptor TLR4, mas somente a *Chlamydia pneumoniae* ativou ambos TLR2 e TLR4.

O receptor TLR2 é mais expresso nas aortas ascendentes, com aterosclerose inicial, do que o receptor TLR4.

REFERÊNCIAS*

ANDERS, H. J.; BANAS, Bernhard; SCHLONDORFF, Detlef. Signaling danger: Toll-like receptors and their potencial roles in kidney disease. **J. Am. Soc. Nepphol.**, v. 15, p.854-867, 2004.

APFALTER, P. Multicenter comparison trial of DNA extraction methods and PCR assays for detection of *Chlamydia pneumoniae* in endarterectomy specimens. **J. Clin. Microbiol.**, v 39, n.2, p.519-24, 2001.

_____. Comparison of a new quantitative ompA-based real-Time PCR TaqMan assay for detection of *Chlamydia pneumoniae* DNA in respiratory specimens with four conventional PCR assays. **J Clin Microbiol**, v. 41, n. 2, p.592-600, 2003.

ARMANT, M. A.; FENTON, M. J. Toll-like receptors: a family of pattern-recognition receptors in mammals. **Genome Biol.**, v. 3, n. 8, p.3011, 2002.

ASHIDA, K. et al. Characterization of the expression of TLR2 (toll-like receptor 2) and TLR4 on circulating monocytes in coronary artery disease. **J Atheroscler Thromb**, v. 12, n. 1, p.53-60, 2005.

BAMAN, T. S. et al. Risk factors and outcomes in patients with coronary artery aneurysms. **Am J Cardiol**.93:1549–1551, 2004.

BELLAND, R. J. et al. *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis. **Cell Microbiol**, v. 6, p.2, p. 117-27, 2004.

BERGER, M. et al.. *Chlamydia pneumoniae* DNA in non-coronary atherosclerotic plaques and circulating leukocytes. **J Lab Clin Med.**, v. 136, n. 3, p.194-200, 2000.

BLASI, F.; DETI, F.; ERBA, M.; Detection of *Chlamydia pneumoniae* but not *Helicobacter pylori* in atherosclerotic plaque of aortic aneurysms. **J. Clin. Microbiol.**, v.34, p.2766-9, 1996.

BLOEMENKAMP, D. G., et al. *Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori* and cytomegalovirus infections and the risk of peripheral arterial disease in young women. **Atherosclerosis**, v. 163, n. 1, p.149-56, 2002.

BOMAN, J.; HAMMERSCHLAG, M. R.. *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis: critical assessment of diagnostic methods and relevance to treatment studies. **Clin Microbiol Rev** 15(1): 1-20, 2002.

BURIAN, K et al. *Chlamydia pneumoniae* Exacerbates Aortic Inflammatory Foci

* De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

Caused by Murine Cytomegalovirus Infection in Normocholesterolemic Mice. **Clin Diagn Lab Immunol.**, v. 8, n. 6, p.1263–1266, Nov. 2001.

BUSTIN, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **J. Mol. Endocrinol.**, v. 25, p.169-93, 2000.

CAO, F. et al. *Chlamydia pneumoniae* – induced macrophage foam cell formation is mediated by Toll-like receptor 2. **Infect Immun.**, v. 75, n. 2, p.753-9, 2007.

CHU, H. W. et al. TLR2 signaling is critical for *Mycoplasma pneumoniae*-induced airway mucin expression. **J Immunol.**, v. 174, n. 9, p.5713-9, 2005.

CHUANG, T.; ULEVITCH; R. J. Identification of hTLR10: a novel human Toll-like receptor preferentially expressed in immune cells. **Biochim Biophys Acta**, v. 1518, n. 1-2, p.157-61, 2001.

CLANCY, R., et al. Chronic *Chlamydia pneumoniae* infection may promote coronary artery disease in humans through enhancing secretion of interleukin-4. **Clin Exp Immunol.**, v. 146, n. 2, p.197-202. 2006.

CONOVER, W. J. **Practical nonparametric statistics**. 3. ed. New York: Wiley, 1999.

COOK, D. N., PISETSKY, D. S.; SCHWARTZ, D. A.. Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease. **Nat. Immunol.**, V. 5, p.975–979. 2004.

COUTINHO, M.S.A.; NAKAMAE, F.J.D.; MENEZES, M.E. *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis . Identification of bacterial DNA in the arterial wall. **Arq. Bras. Cardiol.**, v.74, n. 2, p.124-28, 2000.

DE GRAAF, R. et al. Human heat shock protein 60 stimulates vascular smooth muscle cell proliferation through Toll-like recepto 2 and 4. **Microbes Infect.**, v. 8, n. 7, p.1859-65, 2006.

DISPONÍVEL EM: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em: 06 jun. 2007.

DOHERTY, T. M. et al. TLR signaling and trapped vascular dendritic cells in the development of atherosclerosis. **Trends Immunol.**, v. 27, n. 5, p.222-7, 2006.

DONG, Z. et al. Expression of TLR2 and TLR4 messenger RNA in the epithelial cells of the nasal airway. **Am J Rhinol.**, v. 19, n. 3, p.236-9, 2005.

DROEMANN, D. et al. Toll-like receptor 2 is expressed by alveolar epithelial cells type II and macrophages in the human lung. **Histochem Cell Biol.**, v. 119, n. 2, p.103-8, 2003.

DUNNE, M. The involving relationship between *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v.13, p.583-591, 2000.

DUNZENDORFER; S. et al. Toll-like receptor 4 functions intracellularly in human coronary artery endothelial cells: roles of LBP and sCD14 in mediating LPS responses. **FASEB J.**, v. 18, p.1117–1119, 2004.

EDFELDT, K. et al. Expression of toll-like receptors in human atherosclerotic lesions: a possible pathway for plaque activation. **Circulation**, v. 105, n. 10, p.1158-61, 2002.

EPSTEIN; S. E., et al. Infection and atherosclerosis: emerging mechanistic paradigms. **Circulation** **100**, v. 4, p.20-8, 1999.

ESPINOLA-KLEIN et al. Impact of infectious burden on progression of carotid atherosclerosis. **Stroke** **33**, v. 11, p.2581-6, 2002.

FARSAK, B. et al. Detection of *Chlamydia pneumoniae* and *Helicobacter pylori* DNA in human atherosclerotic plaques by PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v.38, n.12, p.4408-4411, 2000.

FITZNER, N. et al. Human skin endothelial cells can express all 10 TLR genes and respond to respective ligands. **Clin Vaccine Immunol.**, v. 15, n. 1, p.138-46, 2008.

FONG, I. W et al. *Chlamydia pneumoniae* and the cardiovascular system. In: Infections and the cardiovascular system: new perspectives. New York: **Kluwer Academic/Plenum Publishers**, p.121-56, 2003.

FUJITA; M., et al. Involvement of leucine residues at positions 107, 112, and 115 in a leucine-rich repeat motif of human Toll-like receptor 2 in the recognition of diacylated lipoproteins and lipopeptides and *Staphylococcus aureus* peptidoglycans. **J Immunol** v. 171, n. 7, p.3675-83, 2003.

GOTTLIEB; M. G. V.; BONARDI, G.; MORIGUCHI, E. H. Physiopathology and inflammatory aspects of atherosclerosis. **Scientia Medica**, Porto Alegre: PUCRS, v. 15, n. 3, jul./set. 2005.

GUECH-ONGEY, M. et al. *Chlamydia pneumoniae*, heat shock proteins 60 and risk of secondary cardiovascular events in patients with coronary heart disease under special consideration of diabetes: a prospective study. **BMC Cardiovasc Disord**, p.6-17, 2006.

GUEINZIUS, K. et al. Endothelial cells are protected against phagocyte-transmitted *Chlamydia pneumoniae* infections by laminar shear stress Gueinzius: Shear stress protects from *C. pneumoniae* infection. **Atherosclerosis**. Dec. 2007.

HALME, S. et al. *Chlamydia pneumoniae* reactive T lymphocytes in the walls of

abdominal aortic aneurysms. **Eur J Clin Invest.**, v. 29, n. 6, p.546-52, 1999.

HALVORSEN, D. S. et al. No detectable *Chlamydia pneumoniae* and cytomegalovirus DNA in leukocytes in subjects with echolucent and echogenic carotid artery plaques. **Int J Cardiol.**, v. 117, n. 3, p.388-94, 2007.

HARANAGA, S. et al. *Chlamydia pneumoniae* infects and multiplies in lymphocytes in vitro. **Infect. Immun.**, v. 69, n. 12, p.7753-7759, 2001.

HARJA, E. et al. Vascular and inflammatory stresses mediate atherosclerosis via RAGE and its ligands in *apoE^{-/-}* mice. **J Clin Invest.**, v. 118, n. 1, p.183–194, Jan. 2, 2008.

HIGUCHI, M. L. Great amount of *C. pneumoniae* in ruptured plaques vessel segments at autopsy. A comparative study with stable plaques. **Arq. Bras. Cardiol.**, v.72, n.2, p.149-151, 2000.

HIGUCHI, M. L. et al. Co-infection ratios versus inflammation, growth factors and progression of early atheromas. **Apmis.**, v. 114, n. 5, p.338-44, 2006.

_____. Coinfection with *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* in ruptured plaques associated with acute myocardial infarction. **Arq. Bras. Cardiol.**, v.81, n.1, p.12-22, 2003.

_____. *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* in calcified nodules of aortic stenotic valves. **Rev Inst Med Trop.**, v. 44, n. 4, p.209-12, Jul-Aug. 2002.

HIGUCHI, M. L.; RAMIRES, I. A. F. Infectious agents in coronary atheromas: a possible role in the pathogenesis of plaque rupture and acute myocardial infarction. **Rev. Inst. Med. Trop.**, São Paulo, p.217-224, 2002.

HIGUCHI-DOS-SANTOS, M. H. et al. *Chlamydia pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae* in calcified nodes of stenosed aortic valves. **Arq Bras Cardiol.**, v. 84, n. 6, p.443-8, 2005.

HIRATA, T. et al. Expression of toll-like receptors 2, 3, 4, and 9 genes in the human endometrium during the menstrual cycle. **J Reprod Immunol.**, v. 74, v. 1-2, p.53-60, Jun. 2007.

HORNE, B. D. et al. Ig A soropositivity to *Mycoplasma pneumoniae* predicts the diagnosis of coronary artery disease. **Am. J. Coll. Cardiol.**, v.35, p.312, 2002.

HOYMANS, V. Y. et al. Immunohistostaining assays for detection of *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerotic arteries indicate cross-reactions with nonchlamydial plaque constituents. **J Clin Microbiol.**, v. 42, n. 7, p.3219-24, 2004.

IKEDA, H. et al. Interaction of Toll-like receptors with bacterial components induces expression of CDX2 and MUC2 in rat biliary epithelium in vivo and in culture. **Lab Invest.**, v. 87, n. 6, p.559-71, 2007.

INTO, T. et al. Synthesis and characterization of a dipalmitoylated lipopeptide derived from paralogous lipoproteins of *Mycoplasma pneumoniae*. **Infect Immun.**, v. 75, n. 5, p.2253-9, 2007.

IRIZ, E. et al. Effects of atypical pneumonia agents on progression of atherosclerosis and acute coronary syndrome. **Acta Cardiol.**, v. 62, n. 6, p.593-8, 2007.

IZADI, H. et al. c-Jun N-terminal kinase 1 is required for Toll-like receptor 1 gene expression in macrophages. **Infect Immun.**, v. 75, n. 10, p.5027-34, 2007.

JUVONEN, J. et al. Demonstration of *Chlamydia pneumoniae* in the walls of abdominal aortic aneurysms. **J Vasc Surg.**, v. 25, a. 3, p.499-505, 1997.

KAISHO, T.; AKIRA, S. Toll-like receptor function and signaling. **J Allergy Clin Immunol**, v. 117, n. 5, p.979-87, 2006.

KLEIJN, Dominique de; PASTERKAMP, Gerard. Toll-like receptors in cardiovascular diseases. **Cardiovascular Research**, p.58-67, 2003.

KOZAROV, E. et al. Detection of bacterial DNA in atheromatous plaques by quantitative PCR. **Microbes Infect.**, v. 8, n. 3, p.687-93, 2006.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Pathologic Basis of disease**. 7. ed. Koogan: China, 2005.

KUO, C. C. et al. Detection of *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerotic plaques in the walls of arteries of lower extremities from patients undergoing bypass operation for arterial obstruction. **J Vasc Surg.**, v. 26, n. 1, p.29-31, 1997.

_____. Detection of *Chlamydia pneumoniae* in aortic lesions of atherosclerosis by immunocytochemical stain. **Arterioscler Thromb.**, v. 13, n. 10, p.1501-4, Oct. 1993.

LAFLAMME, N. et al. Cooperation between toll-like receptor 2 and 4 in the brain of mice challenged with cell wall components derived from gram-negative and gram-positive bacteria. **Eur J Immunol**. v. 33, n. 4, p.1127-38, Apr. 2003.

LAJUNEN, T. et al. Comparison of polymerase chain reaction methods, in situ hybridization, and enzyme immunoassay for detection of *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerotic carotid plaques. **Diagn Microbiol Infect Dis.**, 2008.

LEE, J. Y.; HWANG, D. H. The modulation of inflammatory gene expression by lipids: mediation through Toll-like receptors. **Mol Cells**, v. 21, n. 2, p.174-85, 2006.

LI, H. et al. Lipopolysaccharide regulates toll-like receptor 4 expression in human aortic smooth muscle cells. **Cell Biology International**, v. 31, p.831-835, 2007.

LIBBY, P. Inflammation and cardiovascular disease mechanisms. **Am J Clin Nutr**, v. 83, n. 2, p.456S-460S, 2006.

LIU, L. et al. *Chlamydia pneumoniae* infection significantly exacerbates aortic atherosclerosis in an LDLR-/- mouse model within six months. **Mol Cell Biochem**, v. 215, n. 1-2, p.123-8, 2000.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) **Method. Methods**, v. 25, n. 4, p.402-8, Dec. 2001.

LOEHE, F. et al. *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerotic lesions of patients undergoing vascular surgery. **Ann Vasc Surg**, v. 16, n. 4, p.467-73, 2002.

LOENS, K. et al. Evaluation of NucliSens easyMAG for automated nucleic acid extraction from various clinical specimens. **J Clin Microbiol**, v. 45, n. 2, p.421-5, 2007.

LOH, G.; BRODIZIAK, F; BLAUT, M. The Toll-like receptors TLR2 and TLR4 do not affect the intestinal microbiota composition in mice. **Environ Microbiol**, v. 10, n. 3, p.709-15, Mar. 2008.

LOSCALZO, J. **Molecular Mechanisms of Atherosclerosis**. Abingdon: Taylor and Francis Group, 2005.

LUSIS, A. J. Atherosclerosis. **Nature**, v. 407, n. 6801, p.233-41, 2000.

MARAH, B. et al. Is *Mycoplasma pneumoniae* Associated with Vascular Disease? **J. Clin. Microbiol**, v. 38, n. 2, p.935-936, 2000.

MAZUR, E. et al. *Chlamydia pneumoniae* infection in abdominal aortic aneurysm (AAA) patients and its clinical impact. **Pol J Pathol**, v. 55, n. 4, p.155-64, 2004.

MEIJER, A. et al. *Chlamydia pneumoniae* antigens, rather than viable bacteria, persist in atherosclerotic lesions. **J Clin Pathol**, v. 53, n. 12, p.911-6, 2000a.

_____. *Chlamydia pneumoniae* in vitro and in vivo: a critical evaluation of in situ detection methods. **J Clin Pathol**, v. 53, n. 12, p.904-10, 2000b.

MICHELSSEN, K. S. et al. Lack of Toll-like receptor 4 or myeloid differentiation factor 88 reduces atherosclerosis and alters plaque phenotype in mice deficient in apolipoprotein E. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 101, n. 29, p.10679-84, 2004.

MOAZED, T. C. et al. *Chlamydia pneumoniae* infection accelerates the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. **J Infect Dis.**, v. 180, n. 1, p.238-41, 1999.

MOON, S. K. et al. Toll-Like Receptor 2-Dependent NF- κ B Activation Is Involved in Nontypeable *Haemophilus influenzae*-Induced Monocyte Chemotactic Protein 1 Up-Regulation in the Spiral Ligament Fibrocytes of the Inner Ear. **Infect Immun.**, v. 75, n. 7, p.3361–3372, Jul., 2007.

MOMIYAMA, Y. et al. Association of *Mycoplasma pneumoniae* infection with coronary artery disease and its interaction with chlamydial infection. **Atherosclerosis**, v. 176, n. 1, p.139-44, 2004.

MUELLER, M. et al. Toll-like receptors 2 and 4 do not contribute to clearance of *Chlamydia pneumoniae* in mice, but are necessary for the release of monokines. **Immunology.**, v. 209, n. 8, p.599-608, 2004.

NETER, J. et al. **Applied linear statistical models**. 4. ed. Chicago, Illinois: Irwin, 1996.

NICHOLS, L.; LAGANA, S.; PARWANI, A. Coronary artery aneurysm: A review and hypothesis regarding etiology. **Arch Pathol Lab Med**.132:823–828, 2008.

NYSTROM-ROSANDER, C. et al. *Chlamydia pneumoniae* in patients undergoing surgery for thoracic aortic disease. **Scand Cardiovasc J.**, v. 36, n. 6, p.329-35, 2002.

_____. *Chlamydia pneumoniae*: Specific mRNA in aorta ascendens in patients undergoing coronary artery by-pass grafting. **Scand J Infect Dis.**, v. 38, n. 9, p.758, 2006.

O'NEILL, L. A. How Toll-like receptors signal: what we know and what we don't know. **Curr Opin Immunol**, v. 18, n. 1, p.3-9. 2006a.

_____. DisSARMing Toll-like receptor signaling. **Nat Immunol**, v. 7, n. 10, p.1023-5. 2006b.

_____. Targeting signal transduction as a strategy to treat inflammatory diseases. **Nat Rev Drug Discov.**, v. 5, n. 7, p.549-63, 2006c.

O'NEILL, Luke A. J. Estopim Imunológico. **Scientif American Brasil**, a. 3. p.68-75. Fev. 2005.

PARKER, Lisa C. et al. The expression and roles of Toll-like receptors in the biology of the human neutrophil. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 77, Jun. 2005.

PICKENS, S.; CATTERALL, J. R. Disseminated intravascular coagulation and myocarditis associated with *Mycoplasma pneumoniae* infection. **Br Med J.**, v. 1, n. 6126, p.1526, 1978.

PIERRI, H. et al. Density of *Chlamydia pneumoniae* is increased in fibrotic and calcified areas of degenerative aortic stenosis. **Int J Cardiol.**, v. 108, n. 1, p.43-7, 2006.

PIRES, L. J.; GUTIERREZ, P. S. Morphometrical quantification of *Chlamydia pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae* in human atherosclerotic abdominal aortic aneurysms. **Rev Bras Cir Cardiovasc.**, v. 22, n. 3, p.322-31, Sep. 2007.

PREBECK, S. et al. Predominant role of toll-like receptor 2 versus 4 in *Chlamydia pneumoniae*-induced activation of dendritic cells. **J Immunol.**, v. 167, n. 6, p.3316-23, 2001.

RAZIN, S. et al. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. **Microbiol Mol Biol Rev.**, v. 62, n. 4, p.1094-156, 1998.

SAITO, T et al. Expression of toll-like receptor 2 and 4 in lipopolysaccharide-induced lung injury in mouse. **Cell Tissue Res.** V. 321, n. 1, p.75-88, Jul. 2005.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 3. ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SANTOS, Fabiana Cristina Pereira. **Resposta inflamatória induzida por agentes infecciosos como mediadores de instabilidade da placa de aterosclerose.** Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2003.

SASU, S. et al. *Chlamydia pneumoniae* and chlamydial heat shock protein 60 stimulate proliferation of human vascular smooth muscle cells via toll-like receptor 4 and p44/p42 mitogen-activated protein kinase activation. **Circ Res.**, v. 89, n. 3, p.244-50, 2001.

SESSA, R. et al. Measurement of *Chlamydia pneumoniae* bacterial load in peripheral blood mononuclear cells may be helpful to assess the state of chlamydial infection in patients with carotid atherosclerotic disease. **Atherosclerosis**, v. 195, n. 1, p.224-30, 2007.

SHI, Y.; TOKUNAGA, O. *Chlamydia pneumoniae* and multiple infections in the aorta contribute to atherosclerosis. **Pathol Int.**, v. 52, n. 12, p.755-63, 2002a.

_____. Herpesvirus (HSV-1, EBV and CMV) infections in atherosclerotic compared with non-atherosclerotic aortic tissue. **Pathol Int.**, v. 52, n. 1, p.31-9, 2002b.

SHIMIZU, T; KIDA, Y.; KUWANO, K. Triacylated lipoproteins derived from *Mycoplasma pneumoniae* activate nuclear factor-kappa B through toll-like receptors

1 and 2. **Immunology**, v. 121, p.473–483, 2007.

SHISHIDO, T. et al. Toll-like receptor-2 modulates ventricular remodeling after myocardial infarction. **Circulation**, v. 108, n. 23, p.2905-10, 2003.

SODECK, G. et al. The role of *Chlamydia pneumoniae* in human aortic disease-a hypothesis revisited. **Eur J Vasc Endovasc Surg**, v. 28, n. 5, p.547-52, 2004.

SOUZA, L. V.; CASTRO, C. C.; CERRI, G. G. Avaliação da carótida. **Radiol Bras** 38 (2): 81-94, 2005.

STOLL, L. L., DENNING, G. M.; WEINTRAUB, N. L.. Potential role of endotoxin as a proinflammatory mediator of atherosclerosis. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** V. 24, n. 1–11, 2004.

SUGIMOTO, K. et al. Expression of functional CD40 in human hepatocellular carcinoma. **Hepatology**, v. 30, n. 4, p.920-6, 1999.

TEMPLETON, K. E. et al. Comparison and evaluation of real-time PCR, real-time nucleic acid sequence-based amplification, conventional PCR, and serology for diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae*. **J Clin Microbiol.**, v. 41, n. 9, p.4366-71, 2003.

TOBIAS, P.; CURTISS, L. K. Thematic review series: The immune system and atherogenesis. Paying the price for pathogen protection: toll receptors in atherogenesis. **J Lipid Res**, v. 46, n.3, p.404-11, 2005.

TONDELLA, M. L. et al. Development and evaluation of real-time PCR-based fluorescence assays for detection of *Chlamydia pneumoniae*. **J Clin Microbiol**, v. 40, n. 2, p.575-83, 2002.

TRANTAFILOU, M. et al. Lipopolysaccharides from atherosclerosis-associate bacteria antagonize TLR4, induce formation of TLR2/1/CD36 complexes in lipid rafts and trigger TLR2-induced inflammatory responses in human vascular endothelial cells. **Cellular Microbiology**, v. 9, n. 8, p.2030–2039, 2007.

TRYON, V. V.; BASEMAN. Pathogenic determinants and mechanisms In J Manillof , *Mycoplasmas molecular biology and pathogenesis*. **Am Soc Microbiol USA**, p.457-471, 1992.

VITSEVA, O. I. et al. Inducible Toll-like Receptor and NF-kappaB Regulatory Pathway Expression in Human Adipose Tissue. **Obesity (Silver Spring)**, v. 16, n. 5, p. 932-7, 2008.

WAITES, K. B. ; TALKINGTON, D. F. *Mycoplasma pneumoniae* and its role as a human pathogen. **Clin Microbiol Rev.**, v. 17, n. 4, p.697-728, table of contents,

2004.

WANG, C. S.; DONG, Z. Expression of toll-like receptor mRNA in epithelial cell of nasal mucosa. **Zhonghua Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi**, v. 38, n. 4, p.243-6, 2003.

WANG, S. S. et al. Circulating Chlamydia pneumoniae DNA and advanced coronary artery disease. **Int J Cardiol.**, v. 118, n. 2, p.215-9, 2007.

WARD, J. R. et al. Agonists of toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 are unable to modulate platelet activation by adenosine diphosphate and platelet activating factor. **Thromb Haemost.**, v. 94, n. 4, p.831-8, 2005.

WASSEF, M. et al. Challenges and opportunities in abdominal aortic aneurysm research. **J Vasc Surg**, v. 45, n. 1, p.192-8, 2007.

WEST, A. P.; KOBLANSKY, A. A.; GHOSH, S. Recognition and Signaling by Toll-like receptors. **Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.**, v. 22, p.409–37, 2006.

WIEDERMANN, C. J. et al. Association of endotoxemia with carotid atherosclerosis and cardiovascular disease:prospective results from the Bruneck Study. **J. Am. Coll. Cardiol**, v. 34, p.1975–1981, 1999.

WU, Q. et al. Toll-like Receptor 2 Down-regulation in Established Mouse Allergic Lungs Contributes to Decreased Mycoplasma Clearance. **Am J Respir Crit Care Med.**, v. 177, p.720–729, 2008.

XU, X. H. et al. Toll-like receptor-4 is expressed by macrophages in murine and human lipid-rich atherosclerotic plaques and upregulated by oxidized LDL. **Circulation**, v. 104, n. 25, p.3103-8, 2001.

YANG, X. H. et al. Expression and significance of toll like receptor 4 mRNA and nuclear factor-kappaB p50 mRNA in human normal nasal mucosa after stimulation by lipopolysaccharide. **Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi**, v. 41, n. 9, p.698-701, 2006.

YANG, X. et al. Toll-like receptor 2 mediates persistent chemokine release by Chlamydia pneumoniae-infected vascular smooth muscle cells. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v. 25, n. 11, p.2308-14, 2005.

YOU, X. X. et al. Interactions between mycoplasma lipid-associated membrane proteins and the host cells. **J Zhejiang Univ Sci B.** v. 7, n. 5, p.342-50, 2006.

ZHU, I. et al. Effects of total pathogen burden on coronary artery disease risk and C-reactive protein levels. **Am. J. Cardiol.** v.85, p.140-146, 2000.

ANEXOS

ANEXO A – Aval da Comissão de Ética FCF-USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO Faculdade de Ciências Farmacêuticas
*Comitê de Ética em Pesquisa - CEP*Ofício CEP nº 53/2006

São Paulo, 25 de abril de 2006.

Ilmo(a). Sr(a).
Renata Melo de Assis
Orientador(a) Prof. Mario H. Hirata
FBC

Prezado(a) Senhor(a),

O Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião realizada em 24 de abril de 2006, **APROVOU** o projeto "Possível envolvimento da *Chlamydia pneumoniae* e *Mycoplasma pneumoniae* na resposta inflamatória da aterosclerose utilizando modelo de aneurisma da aorta abdominal." (Protocolo CEP nº 351) apresentado por Vossa Senhoria.

Lembramos que após a execução de 50% do cronograma do projeto, deverá ser apresentado um relatório parcial, de acordo com o Artigo 18 – item C, da Portaria FCF-111/97.

Atenciosamente,

Assinatura manuscrita em tinta preta, com uma letra inicial 'V' muito grande e decorativa.

Prof. Dra. Valentina Porta
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
FCF/USP

ANEXO B – Aval da Comissão de Ética do InCOR-HC/FMUSP

Mem. CC. 1863

São Paulo, 17 de novembro de 2005.

A
Profa. Dra. Maria de Lourdes Higuchi

Ref.: Protocolo de Pesquisa SDC 2589/05/009

A Comissão Científica do Instituto do Coração, apreciou na sessão 484/05/20 de 17.11.2005, a solicitação de dispensa do termo de responsabilidade assinado pelo paciente do Protocolo de Pesquisa SDC 2589/05/009 **"Diferentes Enfoques na Patogênese das Placas Vulneráveis, Remodelamento Vascular e Aneurismas: Influência do Trombo, Mecanismos Inflamatórios de Agente Infecciosos"**, e foi o seguinte parecer: **"Aprovado"**.

Atenciosamente,

Selma C. Quila Fortunato
Secretária da Comissão Científica
InCor - HC.FMUSP