

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Universidade de São Paulo

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

Resposta inflamatória induzida por agentes infecciosos como  
mediadores de instabilidade da placa de aterosclerose

Fabiana Cristina Pereira dos Santos

Dissertação para obtenção do grau de  
MESTRE

Orientador:  
Prof. Assoc. Mario Hiroyuki Hirata

São Paulo  
2003

17-625

BIBLIOTECA  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Universidade de São Paulo

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

Resposta inflamatória induzida por agentes infecciosos como  
mediadores de instabilidade da placa de aterosclerose

Fabiana Cristina Pereira dos Santos

Dissertação para obtenção do grau de  
MESTRE

Orientador:  
Prof. Assoc. Mario Hiroyuki Hirata

São Paulo  
2003

17.625

---

DEDALUS - Acervo - CQ



30100005473

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

S237r Santos, Fabiana Cristina Pereira dos  
Resposta inflamatória induzida por agentes infecciosos como  
mediadores de instabilidade da placa de aterosclerose / Fabiana  
Cristina Pereira dos Santos. -- São Paulo. 2003.  
73p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.  
Orientador: Hirata, Mario Hiroyuki

1. Aterosclerose 2. Infecção : Sintomatologia I. T. II.  
Hirata, Mario Hiroyuki, orientador.

616.136 CDD

Fabiana Cristina Pereira dos Santos

Resposta inflamatória induzida por agentes infecciosos como mediadores  
de instabilidade da placa de aterosclerose

Comissão Julgadora  
da  
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Assoc. Mario Hiroyuki Hirata  
orientador/presidente

Profa. Dra. Maria de Lourdes Higuchi  
1º. examinador

Profa. Dra. Tânia Cristina Pithon Curi  
2º. examinador

São Paulo, 11 de agosto de 2003.

***“Grandes coisas fez o Senhor por nós,  
por isso estamos alegres”***

*Salmos 126:3*

***Este trabalho é dedicado...***

À Deus, a razão de tudo que faço.

Aos meus pais, Osvaldo e Eliana pelo apoio e incentivo.

Ao meu esposo Luís Eduardo e à minha irmã Valéria, os quais são minha “família” aqui em São Paulo.

Aos meus irmãos Patrícia e Miler, por dividirem comigo momentos de alegria e tristeza.

Ao querido Prof. Assoc. Mario Hirata, por ter sido mais que um orientador, e ter me dado a oportunidade de aprender no mestrado muito mais do que esperava, tanto profissional como pessoalmente.

À Profa. Assoc. Rosario Dominguez Crespo Hirata, pelo suporte indispensável, cumplicidade voluntária e pelo exemplo de profissionalismo e amor ao trabalho.

## **Agradecimentos**

Aos professores da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP, particularmente à Profa. Dra. Eliane Candiani Arantes Braga e à Profa. Dra. Ana Maria de Oliveira, por terem me dado as bases da formação acadêmica e estimulado em mim o amor à pesquisa.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de São Paulo, em nome do seu Diretor, Prof. Tit. Jorge Mancini Filho

À Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior – CAPES, pela bolsa concedida no período de agosto de 2001 a julho de 2003.

Ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêutica da Universidade de São Paulo, em nome do seu chefe, Profa. Tit. Dulcineia Saes Parra Abdalla.

À Profa. Tit. Dulcineia Saes Parra Abdalla, Coordenadora 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.

Aos professores 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.

Aos médicos do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia de São Paulo, cardiologistas Dr. Marcelo Ferraz Sampaio, Dr. Dikran Armaganijan, Dr. Michel Batloune, pelo apoio indispensável para que esse trabalho fosse realizado no instituto.

Aos médicos cirurgiões Dr. Paulo Chacur e Dr. Jarbas Jakson Dikuisen, residentes, enfermeiras, instrumentadoras e assistentes do centro cirúrgico do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, que colaboraram na coleta das amostras de tecido.

---

Ao Dr. Carlos Eduardo dos Santos Ferreira, chefe do Laboratório Clínico do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia e aos funcionários, particularmente à biologista líder do setor de Imunologia, Nívea Aparecida de Campos Salvarani, pela assistência na coordenação das análises laboratoriais.

Aos funcionários do setor de coleta de amostras de sangue, particularmente, Carlos Eduardo Pinto, Luiz Antônio de Lima (Índio) e Dona Ruth Campos de Oliveira de Lima pela colaboração indispensável.

À Dra. Mabel Barros Zamorano, médica patologista do Laboratório de Anatomia Patológica do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, pelo interesse na pesquisa e empenho em realizar uma das análises mais importantes deste trabalho.

À Dra. Lilian Mary da Silva, médica patologista chefe do Laboratório de Anatomia Patológica do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, pelo apoio e interesse por esta pesquisa.

Aos funcionários do Laboratório de Anatomia Patológica do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, particularmente à Abigail Bezerra Magalhães, pela louvável dedicação e cuidado com que preparou as lâminas para análise.

À Dra. Nga Y. Nguyen do CBER-FDA, Bethesda, EUA, pelo fornecimento da cepa padrão de *Chlamydia pneumoniae* e de alguns oligonucleotídeos iniciadores utilizados neste estudo.

Ao Instituto Adolfo Lutz, em nome da Dra. Heloísa Helena Barbosa Melles e Elvira Maria Mendes dos Nascimento, responsáveis pelo Laboratório de Virologia na seção de Riquetsias e Clamídias, pelo suporte e interesse pelo trabalho.

À Silvia Colombo, técnica do pelo Laboratório de Virologia na seção de Riquetsias e Clamídias do Instituto Adolfo Lutz, pela disposição em colaborar no cultivo da *Chlamydia pneumoniae*, demonstrando um espírito de pesquisador que nos levou a superar as dificuldades encontradas.

Ao Centro de Medicina Diagnóstica Fleury, em nome da funcionária responsável pelo setor de microbiologia Silvia Kimie Osugui, pelo fornecimento de cepas isoladas de *H. pylori*.

---



Ao Instituto de Medicina Tropical da Faculdade de Medicina de São Paulo – USP, em nome do Prof. Dr. Cláudio Panuti, pelo fornecimento da cepa padrão de CMV.

Ao Laboratório de Análises Clínicas da Universidade Paulista (UNIP), em nome do Dr. Dirceu Raposo pela execução de alguns ensaios laboratoriais.

À Profa. Dra. Maria de Lourdes Higuchi, médica patologista do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelas sugestões preciosas durante o curso do trabalho, que colaboraram para que o mesmo se tornasse ainda melhor.

Aos pacientes envolvidos neste estudo, que contribuíram de maneira anônima para o melhor entendimento da participação dos agentes infecciosos na resposta inflamatória na placa de aterosclerose.

À empresa Agilent Technologies Brasil LTDA, em nome de Cecília Bonilha e Fulvio Casallanovo Junior, por ceder o equipamento utilizado para quantificação relativa do CD40L.

Especialmente, aos meus pupilinhos Marília Reis Gonçalves Rocha, Raffaella Picciotti, André Ducati Luchessi, Juliana Alonso Uehara, Paula Palmieri, Alice Cristina Rodrigues e Sarah Aparecida Soares, sem os quais este trabalho não teria sido possível, tanto pelo apoio técnico como pessoal.

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Biologia Molecular aplicado ao Diagnóstico do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF-USP: Adriana Natsue Ozaki, Hamilton Massayuki Hinuy, Elizabeth Cecília Rodriguez Guzmán, Marcos de Oliveira Machado, Sun Ok Yoon, Rosilene Fressati Cardoso, Carlos Eduardo de Melo, Leonardo de Oliveira Matsumoto, Simone Cohen Sorkin, Heluih Atta Abdallah, Márcia Keila Nakamura, Ivanise Marina Moretti Rebecchi, Bety Chen, Mustafa Hassan Issa, Patrícia Barco, Vladimir Tavares, Selma Andréa Cavalli,

Francisco José Forasteiro, Letícia Cecon, Paulo Henrique Carbone, Luis Antonio Salazar Navarrete e Érika Miguel de Souza.

Aos meus amigos que passaram pelo laboratório, Rozangela Verlengia, Jô Osugue, Leila Badreddini, Uana Miguel Jorge, Gladys Mossirer, especialmente à Maria Fernanda Pimentel de Carvalho.

Às funcionárias da secretaria do Departamento de Análises Clínicas da FCF-USP: Márcia Cristina Caramico, Sueli Providelo, Ana Maria Dantas e Dora, pelo carinho, torcida e auxílio profissional.

Aos funcionários da Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Farmácia: Elaine Midory, Jorge Alves Lima e Benedita Espírito de Oliveira, pelo seu carinho e auxílio profissional.

Às funcionárias do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF/USP, Claudia Luciano dos Reis, Carmen Lúcia Moura e especialmente Maria Dorlei Moura, pelo seu carinho, atenção e incentivo.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para que esse trabalho se concretizasse.

## Sumário

	página
Resumo	i
Abstract	ii
1. Introdução	1
1.1. Aterosclerose	1
1.2. CD40 e CD40L	3
1.3. Agentes infecciosos	7
1.3.1. <i>Chlamydia pneumoniae</i>	8
1.3.2. Citomegalovírus	12
1.3.3. <i>Helicobacter pylori</i>	14
2. Objetivos	17
2.1. Objetivo geral	17
2.2. Objetivos específicos	17
3. Casuística, material e métodos	18
3.1. Casuística	18
3.1.1. Aspectos éticos	18
3.2. Material	19
3.2.1. Amostras biológicas	19
3.2.2. Cepas de bactérias	19
3.2.3. Materiais descartáveis	20
3.2.4. Reagentes	20
3.2.5. Equipamentos	21
3.3. Métodos	21
3.3.2. Caracterização histológica das placas de aterosclerose	21
3.3.3. Extração de DNA de tecido arterial	22
3.3.4. Extração do DNA das células sanguíneas periféricas	23
3.3.5. Pesquisa do DNA do agente infeccioso	23
3.3.6. Controle de qualidade da PCR qualitativa	25
3.3.6.1. Construção dos controles internos	25
3.3.6.2. Extração de plasmídeo	26
3.3.6.3. Restrição enzimática do plasmídeo e do fragmento dos genes obtidos pela PCR	27
3.3.6.4. Reação de ligação	28
3.3.6.5. Transformação das bactérias competentes	28
3.3.6.6. Transformação da <i>E.coli</i> com o plasmídeo recombinante	28
3.3.7. Análise do controle interno no PCR qualitativo	29
3.3.8. Expressão gênica do CD40L	29
3.3.9. Análise estatística	30

---

<b>4. Resultados</b>	<b>32</b>
4.1. Construção dos controles internos e padronização da PCR	32
4.1.1. <i>Chlamydia pneumoniae</i>	32
4.1.2. Citomegalovírus	34
4.2. Pesquisa dos agentes infecciosos em amostras de sangue pela PCR	36
4.3. Pesquisa dos agentes infecciosos em amostras de tecido arterial coronariano	37
4.4. Correlação entre positividade o tecido e no sangue periférico pela PCR	39
4.5. Análise histopatológica	40
4.6. Análise histopatológica em relação à positividade para os agentes infecciosos	41
4.7. Análise histopatológica em relação à expressão gênica de CD40L	46
4.8. Expressão gênica de CD40L em relação à positividade para os agentes infecciosos	48
<b>5. Discussão</b>	<b>51</b>
5.1. Controles internos	51
5.2 Pesquisa dos agentes infecciosos no sangue e tecido arterial	52
5.3. Análise histopatológica em relação à positividade para os agentes infecciosos	55
5.4. Expressão gênica de CD40L em relação à positividade para os agentes infecciosos	56
<b>6. Conclusões</b>	<b>58</b>
<b>6. Referências bibliográficas</b>	<b>59</b>

---

## RESUMO

Os agentes infecciosos têm sido considerados fatores que predispõem à instabilização da placa de ateroma. Para avaliar esta possibilidade, estudou-se a presença de *Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori* e citomegalovírus (CMV) e sua relação com características de instabilidade da placa aterosclerótica em artérias coronárias obtidas de 37 amostras de pacientes submetidos à endarterectomia (27M, 10F), com idade entre 43 e 84 anos, e 11 amostras de coronárias obtidas de corações nativos de transplantados cardíacos (9M, 2F), com idade entre 30 e 59 anos. Os agentes infecciosos foram detectados por PCR, em DNA extraído de sangue e tecido arterial. A análise histopatológica foi realizada após coloração com HE, Tricômico de Masson e Miller e o estudo da expressão gênica relativa de CD40L por RT-PCR. A percentagem de positividade, no sangue, foi de 39%, 7,3% e 9,8% para *C. pneumoniae*, CMV e *H. pylori*, respectivamente. Foram positivas 62,2%, 67,6% e 18,9% das amostras obtidas por endarterectomia e 100,0%, 100,0% e 54,5% do grupo de amostras de transplantados, para *C. pneumoniae*, CMV e *H. pylori*, respectivamente. A análise histopatológica mostrou associação entre positividade para *C. pneumoniae*, no tecido arterial, e a intensidade da inflamação na lesão aterosclerótica de pacientes endarterectomizados ( $p=0,021$ ), não sendo a mesma observada para CMV e *H. pylori*. A expressão gênica do CD40L foi significativamente maior nas amostras obtidas por endarterectomia positivas para *C. pneumoniae* em relação às negativas ( $p=0,011$ ). Esses dados indicam que a *C. pneumoniae* pode estar envolvida na resposta inflamatória da placa aterosclerótica, mediada pelo sistema CD40/CD40L, favorecendo o processo de desestabilização.

**ABSTRACT**

Atheroma plaque instability has been attributed to the presence of some infectious agents. In the present study, it was evaluated the association of the presence of *Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori* and citomegalovirus (CMV) with instability of the atherosclerotic plaque in coronary arteries obtained from 37 endarterectomized patients (27M, 10F) with age 43 to 84 years old, and from native heart of transplanted patients (9M, 7F) with age 30 to 59 years old. The infectious agents were detected by PCR in peripheral blood samples and plaques obtained from atherosclerosis lesions. Hystopathology evaluation was carried out after Eosin-Hematoxilin, Masson and Miller staining. Expression of CD40L was evaluated by RT-PCR. In peripheral blood, *C. pneumoniae*, CMV and *H. pylori* were positive in 39.0%, 7.3% and 9.8% samples, respectively. In atheroma plaques, 62.2%, 67.6% and 18.9% samples were positive for *C.pneumoniae*, CMV and *H. pylori*, respectively. The positivity in coronaries from transplanted patients was 100.0%, 100.0% and 54.5% for *C. pneumoniae*, CMV and *H. pylori*, respectively. Positivity for *C. pneumoniae* was associated with the degree of inflammation of the atherosclerotic lesions ( $p=0.021$ ), however this relation was not found for *H. pylori* and CMV. CD40L expression was significantly increased in *C. pneumoniae* positive samples ( $p=0.011$ ) compared with negative ones. These results suggest that *C. pneumoniae* can be involved in the inflammatory response and instability of the atherosclerotic plaque.

## 1. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCV) são responsáveis pelas mais altas taxas de morbidade e mortalidade quando comparadas às de outras categorias de doenças humanas, correspondendo a aproximadamente um quarto das mortes na população adulta. A causa mais comum de DCV é a aterosclerose, resultado de alterações vasculares que geralmente evoluem de forma lenta e progressiva, levando à obstrução parcial ou completa do lúmen. Esse processo pode culminar em oclusão aguda por evento trombótico. Nestes casos, freqüentemente ocorre uma deficiência no fluxo sangüíneo para o tecido irrigado pelo vaso acometido, caracterizando o infarto agudo (Chyu, *et al.*, 2001).

### 1.1. Aterosclerose

A aterogênese é um processo complexo e multifatorial, ainda não totalmente esclarecido. Resposta à agressão ao endotélio é a hipótese mais aceita para a etiopatogenia da aterosclerose, que a considera como uma resposta inflamatória crônica da parede arterial, iniciada por alguma forma de lesão do endotélio, devido a alterações hemodinâmicas, hipóxia, presença de endotoxinas ou produtos derivados do cigarro, hiperhomocisteinemia, hipercolesterolemia, e alguns processos infecciosos, entre outros (Gutstein, 1999).

A resposta inflamatória crônica local resulta em disfunção endotelial com aumento da permeabilidade do endotélio vascular e aumento da adesão de leucócitos. Subseqüentemente, ocorre aumento de lipoproteínas, atraídas para a parede do vaso, principalmente lipoproteínas de baixa densidade (LDL), ricas em colesterol, e lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), bem como suas formas modificadas por

---

oxidação. A LDL oxidada é captada por macrófagos, através de receptores específicos (receptor sequestrador), transformando-os em células espumosas. A atividade quimiotática da LDL oxidada atrai monócitos circulantes e promove sua adesão nas células endoteliais por meio de receptores de adesão. Além disso, a LDL oxidada estimula a liberação de fatores de crescimento e induz resposta imunológica com produção de anticorpos contra as lipoproteínas oxidadas (Gutstein, 1999).

A perda da capacidade anti-trombogênica, pela lesão do tecido endotelial, ocasiona a adesão de plaquetas e leucócitos no local da lesão. A liberação de fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGF), de macrófagos e de células vasculares (fator de crescimento fibroblástico - FGF e fator de crescimento tumoral- $\alpha$  - TGF- $\alpha$ ) causa a migração de células musculares lisas da camada vascular média para a íntima, onde há proliferação destas células e produção de matriz extracelular. Nesta fase, pode haver acúmulo de lipídios tanto no meio intracelular (macrófagos e células musculares lisas), como no meio extracelular (Gutstein, 1999).

As células do músculo liso, durante o processo inflamatório na aterosclerose, produzem uma grande quantidade de componentes da matriz extracelular, incluindo colágeno, elastina e vários tipos de proteoglicanas. O fator de crescimento tumoral- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) e outros fatores de crescimento, incluindo PDGF, e fator de crescimento fibroblástico (bFGF), também participam do mecanismo de reparo do tecido lesado. A proliferação e síntese de matriz implicam em um processo lento e progressivo de crescimento da placa, culminando com a estabilização pela formação de uma cápsula fibrosa envolvendo o ateroma. Porém, muitos mediadores produzidos por macrófagos e linfócitos T ativados promovem um efeito desestabilizador na placa (Libby, 2002).

Também a apoptose contribui para desestabilizar a placa de ateroma, podendo ser ativada por mediadores inflamatórios. A apoptose é reconhecida como um mecanismo de morte de células espumosas, levando ao descolamento dos lipídios e amolecimento da camada lipídica no ateroma. Em adição, durante a inflamação, um importante mecanismo de desintegração da placa é iniciado com degradação da matriz extracelular por collagenases intersticiais (MMP1), estromalinas (MMP3) e gelatinases MMP2 e MMP9 (Shah, 2003).

São relacionadas a curso clínico estável placas predominantemente fibrosas, compostas por tecido fibro-celular ou colágeno, contendo ou não pequena quantidade

---



de lipídios extracelulares. Na artéria coronária, as lesões estáveis podem permanecer clinicamente silenciosas, ou progredir lentamente para angina do peito estável (Shah, 2003).

As placas tipicamente instáveis são caracterizadas por predomínio de conteúdo lipídico, cápsula fibrosa delgada ou ausente, presença de infiltrado inflamatório na cápsula fibrosa e camada adventícia e neovascularização. Este tipo de ateroma também é conhecido como placa vulnerável e freqüentemente evolui para trombose, síndrome isquêmica e infarto agudo do miocárdio (Chyu, *et al.*, 2001).

A intensidade da resposta inflamatória na lesão é um fator importante no processo aterosclerótico e está associado à evolução da placa. Atualmente, os mecanismos inflamatórios moleculares têm sido alvo de estudos para o entendimento da fisiopatologia da aterosclerose (Gustein *et al.*, 1999).

## 1.2. CD40 e CD40L

A resposta inflamatória na placa de ateroma envolve uma complexa sinalização intra e intercelular local ainda não completamente esclarecida, envolvendo tanto a liberação de substâncias mediadoras (interleucinas, fatores de crescimento e outros) como a interação por contato entre as células, mediadas por receptores de membrana.

Há um grande interesse na descoberta de como ocorre a comunicação entre as células envolvidas no processo aterosclerótico e qual sua implicação no curso da doença.

Recentemente, foi descoberta, em linfócitos T ativados, a expressão de uma glicoproteína de membrana, chamada CD40L, capaz de interagir com o receptor de membrana conhecido como CD40. O resultado desta interação apresenta grande importância na mediação da resposta imune em doenças inflamatórias crônicas, como aterosclerose (Mach *et al.*, 1998).

A primeira importância do sistema CD40/CD40L, detectada *in vivo*, foi encontrada em pacientes que sofriam de Síndrome Hiper IgM ligado ao X. Estes pacientes apresentavam deficiência na produção de anticorpos devido à incapacidade de proliferação e diferenciação de células T normais, com ausência de anticorpos IgA e IgG circulantes. Estas alterações são causadas por uma deficiência no CD40L em ativar

o linfócito T, provocada por mutação no gene que codifica o domínio extracelular do CD40L. Camundongos transgênicos com disfunção do sistema CD40/CD40L apresentam uma deficiência na resposta do sistema imune semelhante à causada em humanos (Lutgens, *et al.*, 2002)

O CD40 é uma glicoproteína fosforilada de 49 kDa expressa em uma variedade de células, incluindo linfócitos B, monócitos, fibroblastos, células epiteliais e endoteliais. Tem alta homologia com receptores de fator de necrose tumoral- $\alpha$ , e é designado como um membro da superfamília de receptores de fator de crescimento (Mach *et al.*, 1998).

O CD40L, anteriormente conhecido como gp39, também conhecido como CD154, foi primeiramente identificado como uma glicoproteína de superfície celular de 30-33 kDa, presente em linfócitos T CD4+ ativados. Pertence à família de citocinas que inclui o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Hoje, sabe-se que não é apenas expressa em linfócitos T ativados, mas é, também, co-expressa com o CD40 pelas células endoteliais vasculares humanas, pelas células musculares lisas e por macrófagos, tanto *in vitro* como *in vivo* nas lesões ateroscleróticas (Noelle *et al.*, 1992).

Em cultura de células endoteliais vasculares, musculares lisas e macrófagos humanos, foi observado que, em condições de quiescência (livre de soro), existe produção constitutiva basal das duas proteínas, porém quando expostas a citocinas como IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$  e INF $\gamma$ , há um aumento na expressão, tanto de CD40 como de CD40L (Libby e Brien, 1983).

Estudos imunohistoquímicos para avaliar a expressão de CD40 e CD40L em secções de ateroma de carótida humana, mostraram imunorreatividade mais proeminente em regiões da placa entre a lesão e a porção não afetada da artéria. Elevadas concentrações de CD40 e CD40L foram encontradas em células endoteliais, musculares lisas vasculares e macrófagos da placa ateromatosa. Linfócitos T CD4+ no ateroma também expressaram CD40L, um indicativo de ativação dos linfócitos na lesão. Secções de tecido arterial normal não apresentaram expressão de CD40L e apresentaram pouca expressão de CD40 em células endoteliais, indicando que tanto o CD40L como CD40 são marcadores potenciais de tecido vascular aterosclerótico (Mach *et al.*, 1998).

Shulzhenko, *et al.* (2001), estudaram a expressão gênica de CD40L, IFN- $\gamma$  e Fas ligante em 39 amostras de biópsia de endomiocárdio obtidas de 10 adultos

transplantados cardíacos, dentro dos primeiros seis meses após o transplante, e observaram que as amostras que apresentaram os primeiros indícios de rejeição aguda, analisadas por métodos histológicos, tiveram a expressão de CD40L, Fas ligante e, principalmente IFN- $\gamma$  aumentadas em relação às amostras sem evidências histológicas de rejeição. Este estudo propõe a medida do CD40L, IFN- $\gamma$  e Fas ligante para aumentar a sensibilidade do diagnóstico histológico de rejeição aguda de órgãos transplantados.

A ligação CD40/CD40L, produz, nas células endoteliais, a indução da expressão de E-selectina (CD62), de molécula de adesão vascular 1 (VCAM-1, CD106) e de molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1, CD54) (Yellin *et al.*, 1995). Nos macrófagos, desencadeia o aumento da expressão dos receptores CD54, CD80, CD86, do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) de classe II e do próprio CD40 (Kiener *et al.*, 1995). Nas células do músculo liso vascular, não induz a expressão de moléculas de MHC classe II, e nos fibroblastos, leva ao aumento da expressão de CD54 e CD106 (Yellin *et al.*, 1995).

A interação do CD40L/CD40 induz a produção de altas concentrações de algumas citocinas pró-inflamatórias pela parede vascular e macrófagos. Nas células endoteliais e musculares lisas, provoca aumento da liberação das interleucinas IL-6, IL-8 e IL-1 $\beta$ , mas não de TNF- $\alpha$ . Porém em macrófagos, promove a indução da liberação de citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL12, IL15 e TNF- $\alpha$ . Em fibroblastos, leva a produção de IL-6 (Mach *et al.*, 1997). As interleucinas IL12 e IL15, principalmente, estimulam a produção de INF- $\gamma$ , fazendo com que a resposta imune seja predominantemente tipo TH1 (Schönbeck *et al.*, 2001).

A expressão e liberação de citocinas quimiotáticas como IL8, proteínas inflamatórias macrofágicas (MIP1 $\alpha$  e MIP1 $\beta$ ), fator derivado de estroma celular (SDF-1) e proteína quimiotática monocítica (MCP-1), por células endoteliais, musculares lisas, macrófagos e linfócitos T, atraem e direcionam linfócitos T e macrófagos para o ateroma, sustentando a inflamação crônica (Schönbeck *et al.*, 2001).

Schönbeck e Libby, em 2001, mostraram que a interação CD40/CD40L participa da angiogênese através da indução da expressão de cicloxigenase 2 (COX-2) e IL-8. A expressão de COX-2 pode ser estimulada pelo sistema CD40/CD40L em cultura de células endoteliais, musculares lisas e macrófagos, e é particularmente

encontrada em endotélio microvascular de ateroma humano. A COX-2 media a angiogênese através da expressão de fator de crescimento vascular endotelial (VEGF).

As metaloproteinases de matriz (MMP) participam de vários processos da aterogênese, como angiogênese, remodelamento arterial e degradação da capa de colágeno da placa do ateroma. A interação CD40/CD40L promove, nas células endoteliais, musculares lisas e macrófagos, indução da expressão e liberação de colagenase intersticial (MMP-1) e estromelisin-1 (MMP-3). A gelatinase B (MMP-9) é induzida em células endoteliais e musculares lisas, enquanto a gelatinase A (MMP-2), que é expressa constitutivamente pelas células endoteliais e musculares lisas em estado de latência, são liberadas na forma ativada após a sinalização CD40/CD40L (Schönbeck *et al.*, 1997).

Nas células endoteliais e musculares lisas foi demonstrado que, em resposta à ligação do CD40 com seu ligante, existe uma indução da expressão de fator tecidual (Mach *et al.*, 1998).

O CD40L também pode ser encontrado na forma solúvel no sangue, e sua utilização como marcador de instabilidade de placa de ateroma tem sido demonstrada em vários trabalhos. Concentrações elevadas de CD40L solúvel foram encontradas em pacientes com síndrome coronariana aguda em relação ao grupo controle ou em relação ao grupo com angina estável (Peng, *et al.*, 2002), e em pacientes com hipercolesterolemia moderada assintomática em comparação com o grupo controle (Garlichs, *et al.*, 2001).

Utilizando o CD40L como marcador inflamatório sistêmico, Semb, *et al.* (2003) investigaram o efeito de drogas hipocolesterolêmicas na concentração sérica de CD40L solúvel, em pacientes com hipercolesterolemia familiar. Observaram uma redução de aproximadamente 40% na concentração sérica de CD40L nos pacientes após tratamento tanto com atorvastatina (80mg/dia) como com sinvastatina (40mg/dia).

Alguns experimentos em animais com tratamentos utilizando anticorpos anti-CD40L, não mostraram diminuição da área de lesão aterosclerótica, ou número de lesões, mas foi observada transformação da placa instável, rica em lipídios, e pouco colágeno em placa fenotipicamente mais estável (Lutgens, *et al.*, 2002).

O efeito da inibição do sistema CD40/CD40L na morfologia da placa poderia validar o uso de um agente inibidor do CD40L como terapia para aterosclerose, porém,

como o sistema imune do paciente poderia ficar comprometido, acredita-se que seria necessário monitoramento da resposta imune durante o tratamento.

Atualmente, já se utiliza tratamento com anticorpos anti-CD40L, injetados em dose única, em pacientes com lupus eritematoso sistêmico, embora em fase inicial, este tratamento não revelou efeitos adversos sobre o sistema imune, até o momento. Porém, acredita-se que no uso para prevenção ou reversão da instabilidade da placa de ateroma sejam necessárias múltiplas doses, o que pode aumentar o efeito sobre o sistema imune.

A resposta inflamatória tem um papel importante na precocidade e evolução da placa aterosclerótica e sofre influências de fatores de risco genéticos e ambientais. Entre os fatores de risco ambientais, estão as infecções persistentes.

### **1.3. Agentes infecciosos**

As Infecções crônicas têm sido associadas à patogênese da aterosclerose e à instabilidade da placa de ateroma, mas uma relação causal ainda não está estabelecida. Acredita-se que os agentes infecciosos possam participar através de vários mecanismos de ação e em diferentes estágios da aterosclerose. Os microrganismos poderiam circular, através dos monócitos, no sangue periférico e infectar células endoteliais diretamente, iniciando a resposta inflamatória necessária para gênese do processo aterosclerótico. Se a indução ou lesão inicial do endotélio for causada por outro agente iniciador (ex. hipercolesterolemia ou hipertensão), o agente infeccioso poderia acelerar ou amplificar o processo através de muitos mecanismos de ação, entre eles, recrutamento de células inflamatórias, estimulação de citocinas pró-inflamatória e fatores de crescimento tecidual na parede arterial, bem como o aumento de acúmulo de lípidos através da estimulação de receptores seqüestradores ou receptores de LDL. Além disso, os microrganismos, indiretamente, influenciariam no desenvolvimento e progressão da aterosclerose, por um efeito sistêmico, sem invadir diretamente o endotélio arterial. Liberação de endotoxinas ou lipopolissacarídeos na circulação poderia indiretamente danificar o endotélio vascular ou ativar a resposta imune. Liberação de citocinas sistemicamente resultaria em alteração do perfil lipídico, predispondo à aterosclerose ou conduzindo o sistema vascular a um estado pró-

coagulante, resultando em trombose aguda na preexistência de uma placa instável, causando o evento agudo (Fong, *et al.*, 2002).

Alguns microrganismos contêm moléculas que mimetizam componentes celulares dos hospedeiros. O aumento da resposta imune induzida pela infecção pode levar a uma alta frequência de reações cruzadas entre anticorpos e a auto-reatividade de células T. Proteínas *Heat Shock*, as quais são evolutivamente conservadas e estão presentes em ambos microrganismo e célula hospedeira, parecem estar envolvidas no desenvolvimento da autoimunidade (Leinonen, *et al.*, 2002).

*Chlamydia pneumoniae*, citomegalovírus e *Helicobacter pylori* são os agentes infecciosos mais estudados quanto ao seu potencial de associação no processo aterosclerótico.

### 1.3.1. *Chlamydia pneumoniae*

*Chlamydia pneumoniae* é uma bactéria intracelular gram-negativa amplamente distribuída na comunidade. Foi primeiramente isolada da conjuntiva de uma criança taiwanesa, em 1965, em triagem, durante uma campanha de vacinação, quando recebeu o nome de cepa de *Chlamydia* TWAR. A cepa não foi considerada patogênica até 1983 quando foi isolada de trato respiratório de estudante universitário com faringite aguda. Apenas em 1989 a *C. pneumoniae* foi estabelecida como a terceira espécie de *Chlamydia* (Dugan *et al.*, 2002).

O microrganismo tem uma vida bifásica, durante a qual permanece no meio extracelular como corpúsculos elementares e no meio intracelular como corpúsculos reticulados. Os corpúsculos elementares se fixam nas células hospedeiras e são fagocitados. Dentro das células, estes diferenciam-se em reticulados, replicam e formam inclusões citoplasmáticas usando as células hospedeiras como estoque de energia. Os corpúsculos reticulados voltam a ser elementares antes que ocorra a lise celular. A infecção se propaga quando os corpúsculos elementares são liberados no fluido extracelular (Dugan *et al.*, 2002).

A infecção por *C. pneumoniae* é responsável por cerca de 10% das pneumonias comunitárias e a soro-prevalência é alta na idade adulta. Estima-se que a maioria dos

indivíduos será exposta, pelo menos uma vez, a *C. pneumoniae*, em algum período da vida (Coutinho, *et al.*, 2000).

O primeiro relato da possível conexão entre *C. pneumoniae* e aterosclerose resultou de um estudo soro-epidemiológico realizado na Finlândia, em 1988 por Sakku, *et al.* Este estudo mostrou que indivíduos com doença arterial coronariana tinham frequência de soro-positividade para *C. pneumoniae* maior do que no grupo controle. Em 1996, Wimmer, *et al.*, demonstraram que títulos elevados para *C. pneumoniae* estão associados com doença cerebrovascular.

Estudos recentes demonstraram associação entre infecção por *C. pneumoniae* com títulos altos de IgG e IgA, com expansão e progressão do aneurisma aórtico abdominal (Lindholt, *et al.*, 2001).

Em 1992, Shor *et al.*, identificaram pela primeira vez a presença de *C. pneumoniae* em placas de aterosclerose, em artérias coronárias por microscopia eletrônica, PCR e imunocitoquímica, com anticorpo monoclonal *C. pneumoniae*-específico. Desde então, vários trabalhos têm sido publicados mostrando associação entre a presença de *C. pneumoniae* e aterosclerose (Kuo, *et al.* 1993, Grayston *et al.* 1995, Campbell, *et al.* 1995, Ong *et al.*, 1996, Blasi *et al.*, 1996, Wong *et al.*, 1999). Danesh, *et al.* (1997), em uma revisão de 13 estudos fisiopatológicos utilizando diferentes técnicas observaram que, em geral, cerca de 52% das lesões ateromatosas possuíam *C. pneumoniae*. Os controles nestes estudos mostraram positividade de aproximadamente 5%; isto significa que há uma chance 10 vezes (95% IC 5-22) maior de se identificar a *C. pneumoniae* em um vaso com aterosclerose do que em um vaso normal. Recentemente, Loehe, *et al.* (2002) detectaram a presença de *C. pneumoniae* em 50% das amostras arteriais de pacientes abaixo de 60 anos de idade, e em 75% dos pacientes acima de 80 anos.

A partir da constatação da alta prevalência de *C. pneumoniae* em tecidos ateroscleróticos, pesquisas têm sido desenvolvidas com a finalidade de propor mecanismos de ação para o envolvimento do agente infeccioso no processo aterosclerótico.

Melissano, *et al.* (1999) demonstraram que *C. pneumoniae* é capaz de estimular no endotélio a produção de fator tecidual, com ativação da cascata de coagulação, adesão plaquetária e, conseqüentemente trombose local. Adicionalmente, foi observado que *C.*

*pneumoniae* provoca aumento da expressão de moléculas de adesão em cultura de células endoteliais e em monócitos de cérebro humano, e também promove a migração de monócitos através das células endoteliais *in vitro*, devido à liberação de IL8 e MCP1 (Macintyre, *et al.*, 2002).

A infecção por *C.pneumoniae*, em células endoteliais ou musculares lisas, ativa o fator nuclear  $\kappa$ B (especificamente o fator nuclear heterodímero  $\kappa$ B p50/p65), que estimula a proliferação celular e está associado ao processo inflamatório na aterosclerose e reestenose (Dunne, *et al.*, 2000).

Haranaga, *et al.*(2001) observaram que linfócitos T podem ser infectados por *C. pneumoniae* e suportar o crescimento da bactéria *in vitro*, sugerindo um possível caminho de infecção via linfócitos.

*C. pneumoniae* também está envolvida no estímulo para formação de células espumosas. Especificamente, lipopolissacarídeos de *C. pneumoniae* promovem o aumento de captação de LDL pelas células mononucleares, enquanto a proteína *Heat Shock* (HSP60) isolada da *C. pneumoniae* induz a oxidação da LDL (Dunne, *et al.*, 2000).

A proteína clamidial HSP60 tem seqüência altamente homóloga a proteínas HSP de mamíferos. Observou-se que um peptídeo da cadeia alfa-miosina do músculo cardíaco murino, que tem seqüência homóloga à principal proteína de membrana clamidial com 60 kDa rica em cistina, induziu doença cardíaca de origem auto-imune em camundongo. Uma injeção da proteína clamidial homóloga induz inflamação perivascular, fibrose e oclusão de vasos do coração. Este mecanismo poderia estar associado à gênese da miocardite e cardiomiopatia (Leinonen, *et al.*, 2002).

Linhagens de células T foram propagadas a partir de 17 espécimes de tecido de endarterectomia de carótida, e destas, 7 (41%) reconheceram antígenos específicos de *C. pneumoniae*. Cinco, destas sete, foram induzidas à proliferação com HSP-60 clamidial; uma das quais também respondeu a HSP60 humana. Estas observações indicam que alguns componentes do processo aterosclerótico podem ser consequência de uma reação imune (Dunne, *et al.*, 2000).

*In vitro*, a HSP60 clamidial ativa macrófagos e induz a produção de TNF- $\alpha$  e metaloproteinases de matriz, que causam a degradação do tecido conectivo favorecendo a ruptura da placa aterosclerótica (Ngeh, *et al.*, 2002).



Em modelo de infecção contínua, em cultura de célula HEp2 inoculada com *C. pneumoniae*, foi estudado o efeito do tratamento prolongado com azitromicina, levofloxacino e claritromicina. Estes estudos observaram que os antibióticos não foram capazes de eliminar completamente o microrganismo, induzindo a formação de subpopulações com inclusões anormais, similares às formas resistentes induzidas após o tratamento com interferon  $\gamma$  (Kutlin, *et al.*, 2002).

Os modelos animais de aterosclerose, em coelhos e camundongos, têm sido utilizados para avaliar a capacidade da infecção pela *C. pneumoniae* em induzir aterosclerose. Em coelhos brancos não hipercolesterolêmicos, da Nova Zelândia, foi demonstrado que a *C. pneumoniae* pode causar lesões ateromatosas em aortas, e aumentar a espessura da camada íntima do vaso em até 40% após inoculação intranasal. Essas alterações foram evitadas pelo tratamento com azitromicina e atenuado com claritromicina, em fase precoce, mas não foram revertidas pelo tratamento com início tardio. Nenhuma alteração aterosclerótica foi induzida no mesmo modelo infectado por *Mycoplasma pneumoniae*, o qual foi utilizado como controle (Fong, *et al.*, 1999, 2002).

Camundongos deficientes de Apo E desenvolvem espontaneamente lesões ateroscleróticas, e a infecção por *C. pneumoniae* provoca um aumento das lesões do tipo estrias gordurosas, em comparação ao grupo não infectado (Moazed, *et al.*, 1999).

Rothstein *et al.* (2001) observaram que o tratamento com azitromicina em camundongos deficientes de ApoE, por 4 a 5 semanas após infecção com *C. pneumoniae*, não teve efeito sobre a extensão da lesão aterogênica.

O tratamento da infecção aguda com alta dose de azitromicina por 10 semanas, em coelho, foi associado à redução da espessura da camada íntima do vaso, mas não foi capaz de eliminar completamente o microrganismo, evidenciado por imuno-histoquímica (Fong, *et al.*, 1999).

A implicação desses dados para a prevenção secundária humana é que o tratamento com antibióticos pode não ser benéfico, uma vez que a infecção por *C. pneumoniae* em pacientes com DAC, na maioria dos estudos, provavelmente não é aguda (Boman, *et al.*, 2002). Além disso, um dos grandes consensos em relação ao uso prolongado de tratamento com antibiótico para *C. pneumoniae* é o desenvolvimento de resistência ou infecções secundárias. Dois pacientes que participaram do estudo

ACADEMIC, os quais receberam azitromicina cronicamente, desenvolveram infecção secundária por *Cândida sp* (Dugan, *et al.*, 2002).

### 1.3.2. Citomegalovírus (CMV)

Em humanos, estudos epidemiológicos clínicos, *in vivo* e *in vitro*, sugerem uma relação entre infecção por herpesvírus e a aterosclerose. Do grupo dos herpesvírus, o citomegalovírus (CMV) tem demonstrado o maior número de indícios sugerindo sua participação no processo aterosclerótico, tanto em humanos como em modelos animais.

O vírus CMV tem sido associado ao desenvolvimento de diferentes doenças vasculares, incluindo aterosclerose, rejeição vascular crônica do enxerto e reestenose após angioplastia (Reinhardt, *et al.*, 2002). A primeira associação, entre CMV e aterosclerose, surgiu de um estudo clínico, o qual mostrou que pacientes com altos títulos de anticorpos para CMV tinham maior risco para o desenvolvimento de lesões ateroscleróticas graves (Adam, *et al.*, 1987).

Recentemente, foi demonstrado, *in vitro*, que em células com infecção latente por citomegalovírus, a co-infecção por *C. pneumoniae* pode levar a 'reativação' do vírus, sugerindo que a infecção com múltiplos patógenos pode exercer efeitos aditivos ou sinérgicos (Zhou, *et al.*, 1999). Gattone, *et al.*, (2001) avaliaram a influência da soropositividade para *C. pneumoniae* e CMV sobre a ocorrência de infarto agudo do miocárdio precoce, e observaram que a combinação de ambas infecções está associada ao aumento da resposta inflamatória e risco para infarto agudo precoce.

Posteriormente, ácidos nucleicos de CMV foram detectados pela PCR em 90% dos casos de aterosclerose grave, e 53% dos casos com lesões ateroscleróticas mínimas (Hendrix, *et al.*, 1991). O CMV foi encontrado nas principais células envolvidas no processo aterosclerótico: células musculares lisas, endoteliais e mononucleares.

Em artérias carótidas e aorta de 76 pacientes com estenose arterial, *C. pneumoniae* foi detectada em 71%, CMV em 35,5% e vírus da herpes simples (HSV) em 10,5%, enquanto as amostras do grupo controle sem estenose apresentaram ausência de ácido nucleico dos três agentes pela PCR. Ainda neste estudo, foi observado que as placas de aterosclerose com trombose apresentaram maior

freqüência de *C. pneumoniae* e CMV do que as placas sem trombose (Chiu, *et al.*, 1997).

Em modelos de transplante aórtico em ratos, a infecção por CMV aumenta a inflamação na camada adventícia e acelera a formação de neointima. Esse efeito pode ser eliminado completamente pela atividade antiviral de drogas como ganciclovir e cidofovir (Lemström, *et al.*, 1993).

Em humanos, a rejeição crônica ocasionada pela aterosclerose aguda do enxerto é a principal causa de morte após o primeiro ano pós-transplante. Em angiografia coronariana, a incidência de vasculopatia cardíaca do enxerto é superior a 50% até cinco anos pós-transplante. Muitos estudos clínicos sugerem um papel importante para a infecção por CMV no desenvolvimento precoce da vasculopatia do enxerto (Grattan, *et al.*, 1989, Cainelli, *et al.*, 2002), embora existam trabalhos contraditórios (Sambiase, *et al.*, 2000).

O CMV tem um papel importante também na reestenose, devido à interação da proteína supressora de tumor p53, e produtos gerados pelos genes de expressão precoce e imediata, resultando na proliferação exacerbada de células musculares lisas e inibição de apoptoses (Speir, *et al.*, 1995, Zhou, *et al.*, 1999).

Estudos experimentais demonstram que a infecção por CMV estimula a produção de citocinas pelas células inflamatórias, amplificando a resposta inflamatória. Este efeito pode não ser induzido apenas pela infecção viral ativa, mas também por genes de expressão precoce imediata (em fase de latência), sugerindo que a ativação pode ocorrer na ausência de infecção produtiva (Bruggeman, *et al.*, 2000).

Sabe-se também que a infecção de células endoteliais por CMV induz atividades pró-coagulantes que levam a um aumento da expressão de moléculas de adesão e ativação de leucócitos com indução da produção de citocinas (Reinhardt, *et al.*, 2002).

Modelos de camundongos com deficiência de ApoE infectados com CMV murino têm o processo aterosclerótico exacerbado com aumento do influxo de linfócitos T nas lesões. Esse efeito não é observado em camundongos não transgênicos C57B1/6 (Vliegen, *et al.*, 2002). O CMV pode induzir atividade pró-coagulante em células endoteliais humanas. A razão para esse efeito é que as moléculas de superfície do CMV contêm um fosfolípido, o qual promove a ativação de um complexo funcional

entre o fator Xa e o cofator Va, culminando com atividade protrombinase e levando à geração de trombina (Degré, *et al.*, 2002).

Lin, *et al.*, (2002) pesquisaram a presença de CMV pela PCR em 15 cérebros *pós morte* de pacientes que sofreram de demência vascular e em 38 cérebros sem alteração neurológica de indivíduos idosos, e também observaram uma forte associação ( $p=0,0002$ ) entre presença de CMV no cérebro e demência vascular.

Devem ser realizados mais estudos para esclarecer a contribuição da infecção por CMV nos processos de aterosclerose, bem como a eficiência da terapia anti-CMV na evolução da doença (Zhou, *et al.*, 1999).

### 1.3.3. *Helicobacter pylori*

A *Helicobacter pylori* é responsável por uma das mais disseminadas doenças infecciosas humanas. Cerca de metade da população adulta possui evidências sorológicas da infecção. Porém, apenas uma de cinco pessoas infectadas desenvolve doença ulcerativa (Mach, *et al.*, 2002).

*H. pylori* é uma bactéria extracelular, microaerófila, com formato espiralado, e gram-negativa, cujo nicho natural é o estômago humano, onde reside no muco e no epitélio gástrico. Macroscopicamente, a infecção por *H. pylori* apresenta poucas alterações nas mucosas gástricas. Microscopicamente, porém, a colonização é freqüentemente caracterizada por infiltrado de neutrófilo na mucosa gástrica (Kusters, *et al.*, 1999).

A participação da *H. pylori* na aterosclerose ainda não está bem definida. Estudos epidemiológicos e clínicos sugerem uma associação entre soropositividade para *H. pylori* e fatores de risco cardiovasculares e doença cardíaca isquêmica (Folson, *et al.*, 1998; Pasceri, *et al.*, 1998). Em 1994, Mendall *et al.* mostraram que a soropositividade para *H. pylori* era duas vezes mais freqüente em pacientes com doença coronariana do que em indivíduos controle.

As cepas de *H. pylori* podem apresentar diferentes graus de virulência. Está bem estabelecido que as portadoras do gene da citotoxina A (*CagA*) desempenham um papel patogênico definido na manifestação da úlcera péptica. Malnick, *et al.*, em 1999 demonstraram a existência de associação entre infecções por cepas de *H. pylori* mais

virulentas (*CagA* positiva) com doença cardíaca isquêmica, do que com cepas *Ca A* negativa. Em 2003, Mayr, *et al.*, avaliaram soropositividade para *H. pylori* e para o gene associado à citotoxina *Cag A* em 684 indivíduos e observaram, por ensaios sorológicos, que as cepas virulentas *Cag A* estão associadas ao aumento da espessura da camada íntima da artéria carótida.

O mecanismo de ação proposto para a participação da *H. pylori* na aterosclerose mais aceito entre os pesquisadores, seria através de uma ação indireta pela indução de resposta inflamatória crônica em longo prazo, levando a liberação crônica de mediadores inflamatórios, à aumento das concentrações de proteínas de fase aguda (como fibrinogênio, proteína C-reativa) e ao exacerbado número de leucócitos circulantes, resultando em um aumento do risco para doença arterial coronariana (Folsom, *et al.*, 1998).

Mais recentemente, alguns trabalhos demonstraram a presença de *H. pylori* na lesão aterosclerótica *in situ*, mas não em tecido não aterosclerótico (Farsak, *et al.*, 2000; Ameriso, *et al.*, 2001). Kowalski, *et al.* (2002), pesquisaram *H. pylori*, pela PCR, em amostras de tecido de 46 pacientes com doença arterial coronariana e encontraram correlação entre a presença da bactéria e o primeiro evento de IAM ( $p=0,008$ ) e com angina instável ( $p<0,001$ ). Com esses achados, um novo mecanismo de ação foi proposto, envolvendo a *H. pylori* na doença cardiovascular, onde o agente infeccioso alcançaria a corrente circulatória e colonizaria regiões suscetíveis dos vasos, contribuindo diretamente para o desenvolvimento da placa de aterosclerose, por estimulação da resposta inflamatória local (Malnick, *et al.*, 1999).

Contribuindo para a hipótese do mecanismo de ação direta sobre o vaso, Ameriso, *et al.*, (2001) pesquisaram, através de imuno-histoquímica, a presença de *H. pylori* em placas de aterosclerose de artérias carótidas e a expressão de moléculas de adesão ICAM-1 e VCAM-1. Os dados obtidos mostraram que nas regiões onde a bactéria estava presente, a expressão das moléculas inflamatórias também estava aumentada.

Mach, *et al.*, 2002 estudaram o efeito da infecção via oral de cepa *CagA* positiva, em camundongos selvagens C57/B16 e deficientes de receptor de LDL. Os animais receberam dieta rica em colesterol por 6 a 8 semanas. A infecção por *H. pylori* não influenciou na progressão da lesão ou na deposição de lipídios. A proporção de

macrófagos e linfócitos T na lesão aterosclerótica também não foi diferente entre os grupos infectados e não infectados. Estes dados sugerem que, em modelo de aterosclerose em camundongo selvagem e deficiente de receptor de LDL, a infecção por *H. pylori* não contribui para a formação e desenvolvimento da lesão aterosclerótica.

Os estudos relacionando a infecção por *H. pylori* e a doença arterial coronariana ainda são escassos, e os dados ainda não são suficientes para estabelecer a relação entre *H. pylori* e doença arterial coronariana.

O presente estudo trata de fatores de risco emergentes (doenças infecciosas), como participantes potencialmente ativos na evolução e desestabilização da placa aterosclerótica.

A *C. pneumoniae*, a *H. pylori* e o citomegalovírus humano já foram identificados em placas de aterosclerose de vários pacientes por diversos métodos, porém ainda existem poucas comprovações da participação efetiva destes agentes no processo de aterosclerose, bem como dados sobre os mecanismos pelos quais estariam agindo. A pesquisa do efeito da presença do agente infeccioso na resposta inflamatória local da placa pela expressão de CD40 e CD40L pode trazer mais informações sobre a participação destes agentes na fisiopatologia da aterosclerose.

Os resultados deste trabalho podem contribuir para esclarecer a importância das doenças infecciosas no desenvolvimento da aterosclerose, sob o ponto de vista da participação na resposta inflamatória que leva à desestabilização da placa aterosclerótica, que constitui a principal causa de trombose e, conseqüentemente, infarto agudo do miocárdio.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

O objetivo deste estudo foi de avaliar a presença e a participação dos agentes infecciosos *Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori* e citomegalovírus, na resposta inflamatória que leva à instabilização das placas de aterosclerose.

### 2.2. Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste projeto são:

- Pesquisar a incidência de *Chlamydia pneumoniae*, citomegalovírus e *Helicobacter pylori*, no sangue periférico, pela PCR, de pacientes com DAC, submetidos à cirurgia de endarterectomia da artéria coronária, e de pacientes receptores de transplante cardíaco.
  - Pesquisar a incidência dos mesmos agentes infecciosos em tecido arterial coronariano obtido dos pacientes submetidos à endarterectomia e dos corações nativos dos pacientes transplantados e relacionar com indícios de instabilidade da lesão aterosclerótica, analisada pela histopatologia.
  - Avaliar a relação entre a positividade para os agentes infecciosos e a expressão gênica relativa do marcador de resposta inflamatória CD40L, pela RT-PCR.
-

### **3. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Casuística**

O grupo de estudo foi constituído por 37 indivíduos portadores de DAC, com idade variando entre 43 e 84 anos, de ambos os sexos, sendo 27 do sexo masculino, os quais foram submetidos à cirurgia de revascularização do miocárdio com endarterectomia, e 11 pacientes submetidos a transplante de coração, com idade variando entre 30 e 59 anos, de ambos os sexos, sendo 9 do sexo masculino, seleccionados no Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia.

##### **3.1.1. Aspectos Éticos**

O presente trabalho contou com a colaboração dos médicos cardiologistas, patologistas e cirurgiões do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, que foram responsáveis pelo fornecimento das amostras e caracterização histológica do material. Os pacientes assinaram um termo de consentimento, após esclarecimento, autorizando o uso do material biológico, incluindo o sangue e o tecido obtido na cirurgia, para fins de pesquisa.

O estudo foi submetido e aprovado pelas Comissões de Ética do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia e da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de São Paulo da Universidade de São Paulo.



## 3.2. Material

### 3.2.1. Amostras biológicas

As amostras de tecido foram colhidas durante as cirurgias, imediatamente colocadas em criotubos estéreis e congeladas em nitrogênio líquido para serem processadas posteriormente. No dia do processamento, a amostra foi fragmentada em anéis de aproximadamente 2mm, aleatoriamente separados para extração de RNA, DNA e caracterização histológica. Para caracterização histológica, as amostras foram conservadas em formol 4% tamponado e, em seguida, inseridas em blocos de parafina.

O grupo de estudo-1 foi constituído por 37 amostras de tecido vascular arterial coronariano macroscopicamente aterosclerótico, extraído pelo processo de endarterectomia durante cirurgia para revascularização do miocárdio.

O grupo de estudo-2 foi constituído por 11 amostras, de tecido vascular arterial coronariano, obtidos de corações de pacientes receptores de transplante cardíaco com ou sem aterosclerose.

Entre o quinto e sétimo dia do pós-operatório foram colhidos 4,5 mL de sangue periférico, em tubo com anticoagulante EDTA, para pesquisa de DNA.

### 3.2.2. Cepas de bactérias

A cepa padrão de *C. pneumoniae* AR-39 foi adquirida do *American Type Culture Collection*, (Manassas, VA, USA), cultivadas no laboratório de Virologia do Instituto Adolfo Lutz, em células *Hep2* e meio de cultura mínimo essencial (MEM), com de 10% de soro bovino fetal, cicloeximida 1 µg/mL, vancomicina 25 µg/mL, gentamicina 10 µg/mL e anfotericina B 3 µg/mL, sob a coordenação da Dra. Heloísa Barbosa. As bactérias foram repicadas a cada 72 h e o crescimento foi monitorado por imunofluorescência indireta.

Amostras de cultura de *C. pneumoniae* AR-39 foram submetidas à extração de DNA (descrita no item 3.3.4) e utilizadas para a construção do controle interno e como controle positivo para a PCR.

Amostras de cultura de células padrão de CMV AD-160 foram cedidas gentilmente pelo Prof. Dr. Cláudio S. Pannuti, do Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.

O DNA extraído (como descrito no item 3.3.4) das culturas padrão foi utilizado como controle positivo para a PCR e para construção do controle interno.

O DNA de *H. pylori*, para a construção do controle interno e utilização como controle positivo, foi extraído de cultura de biópsia em meio específico para a bactéria descrito por Queiroz, *et al.* 1987, com confirmação pelo gram e urease.

### 3.2.3. Materiais descartáveis

Foram utilizados tubos de tipo eppendorf de 0,2 mL, 0,5 mL, 1,5 mL, criotubos de 2 mL, ponteiros descartáveis de 100 a 1000  $\mu$ L (com filtro para aerossol), ponteiros descartáveis de 10 a 100  $\mu$ L (com filtro para aerossol), ponteiros de 1 a 10  $\mu$ L (utramicro, com filtro para aerossol), recipiente para descarte de ponteiros, suporte para tubos e luvas descartáveis.

### 3.2.4. Reagentes

O Triton X-100, cloreto de sódio, cloreto de potássio, etanol absoluto, isopropanol, clorofôrmio, azul de bromofenol foram adquiridos da MERCK S.A. (Ind. Química, R.J., Brasil); cloreto de magnésio, da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA); hidróxido de sódio, fenol, SDS, ácido bórico, EDTA, Tris (hidroximetil) aminometano ultrapuro, enzimas de restrição, marcadores moleculares de tamanho molecular de DNA de 100 bp, 1Kb, proteinase K (Fungal), kit de purificação de DNA Concert™ Gel Extraction System, da Gibco BRL, Life Technologies, Inc. (Gaithersburg, MD, E.U.A.); *Taq* DNA polimerase, solução de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), agarose ultra pura, kit de extração e purificação de plasmídeos *FlexiPrep*, brometo de etídeo e a enzima T4 Ligase, da Amersham Biosciences (Piscataway/NJ, EUA); os diferentes iniciadores (oligonucleotídeos específicos), da Life Technologies do Brasil; as enzimas de restrição, *EcoRI* e *Bam HI*, e o Reagente de TRIzol, da Invitrogen™ Life Technologies (Rockville/MD, EUA).

### 3.2.5. Equipamentos

Espectrofotômetro UV para quantificação de ácidos nucleicos Gene Quant da Pharmacia (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia); sistema de eletroforese horizontal com cuba submarina, fonte de eletroforese (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, Life Technologies, Inc.), termociclador automatizado DNA Engine PTC 200 MJ. Research (Waltham, MA, USA); freezer *upright Ultra-low*, temperatura  $-80^{\circ}\text{C}$  (Forma Scientific, Ohio, EUA); forno de microondas; fluxo laminar Veco (Campinas, Brasil); centrífuga clínica Celm (Brasil), centrífuga Eppendorf refrigerada modelo 5804 (Hamburg, Alemanha); banhos de água; jogo de pipetas Gilson de 10  $\mu\text{L}$ , 20  $\mu\text{L}$ , 100  $\mu\text{L}$ , 200  $\mu\text{L}$  e 1000  $\mu\text{L}$ ; balanças analítica e semi-analítica, pHmetro, computador pentium MMX 466, 32 e impressora HP 870, sistema de análise de imagem Multimage modelo ALPHA IMAGE 2200 (AlphaInnotech, San Leandro CA, USA), impressora térmica Mitsubishi (Japão, modelo CP700D), papel térmico UPP 110 HD Sony e centrífuga concentradora Eppendorf, modelo 5301 (Hamburg, Alemanha), Analisador de DNA, Mod 2100 bioanalyzer, (Waldbronn, Alemanha) e lupa Zeiss Stmi SV6 com câmera semi-digital Sony XC003P (Thornwood, NY, USA)

### 3.3. Métodos

#### 3.3.2. Caracterização histológica das placas de aterosclerose

A avaliação de rotina em cortes histológicos do material biológico, incluído em parafina, foi realizada pela Dr<sup>a</sup>. Mabel de Moura Barros Zamorano do Departamento de Patologia do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia.

As colorações utilizadas para a análise incluem: Hematoxilina-eosina, Tricrômico de Masson - para tecido conjuntivo e Miller – para tecido elástico.

A análise foi subjetiva e todas foram realizadas pelo mesmo observador. As amostras foram avaliadas pela presença de fibrose, conteúdo lipídico, calcificações, infiltrado inflamatório, esses parâmetros foram graduados subjetivamente em leves,

moderados e intensos. Também foi observada a presença de trombose, hemorragia e ruptura.

### 3.3.3. Extração de DNA do tecido arterial

Após o descongelamento, aproximadamente 30 mg de tecido arterial coronariano foram macerados em homogeneizador de vidro tipo *Potter* com 480  $\mu\text{L}$  do tampão de digestão (Tris-HCl 100mM pH=8,0, EDTA 5mM pH=8,0, Tween 20 a 1%, TritonX-100 a 1%). Ao macerado foram adicionados 20  $\mu\text{L}$  de proteinase K (25mg/mL), homogeneizado e incubado em banho de água por 24 h à temperatura de 37 °C, sendo periodicamente homogeneizado nesse período. A seguir, foi adicionado 1,0 mL do MIX 1, contendo fenol, clorofórmio e álcool isoamílico na proporção 25:24:1, homogeneizado vigorosamente por 15 segundos e transferido para tubo de 1,5 mL tipo Eppendorf estéril, centrifugado a 12.000 g por 5 min e a fase superior (aquosa) transferida para novo tubo de 1,5 mL estéril. Esse procedimento foi repetido 2 vezes. A seguir, foram adicionados 2 volumes do MIX 2 contendo clorofórmio e álcool isoamílico na proporção 24:1, homogeneizado vigorosamente por 15 segundos, centrifugado a 12.000 g por 5 min e a fase superior (aquosa) transferida para novo tubo de 1,5 mL estéril. Foram adicionados 2 volumes do MIX 3 contendo acetato de amônio a 8 M e etanol P.A. na proporção 25:75 e o tubo foi agitado delicadamente e mantido em repouso *over night* a -20°C.

A seguir, o tubo foi centrifugado a 12.000 g por 30 min, o sobrenadante desprezado e o *pellet* re-suspenso em 50  $\mu\text{L}$  de água Milli Q estéril. Ao precipitado foram adicionados 550  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto gelado, e a mistura foi delicadamente agitada e centrifugada 12.000 g por 30 min. O sobrenadante foi desprezado e o tubo contendo o *pellet* de DNA foi seco através do concentrador a vácuo por 10 min a 45°C.

Em seguida, foram adicionados 30  $\mu\text{L}$  do tampão Tris EDTA (Tris-HCl 10mM e 1 mM EDTA, pH=8,0), homogeneizado e incubado em banho de água a 56°C por 15 min e armazenado a -20°C.

A integridade das amostras de DNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídeo, visualizado em UV e registrado em sistema digitalizado. A quantificação e análise da pureza das amostras de DNA extraído

foram realizadas por espectrofotometria em UV após diluição (1:20) das amostras em tampão TE (Sambrook *et al.*, 1989).

#### **3.3.4. Extração do DNA das células sanguíneas periféricas**

O DNA genômico foi extraído a partir de 1 mL de sangue total, pelo método de precipitação salina descrito por Salazar *et al.* (1998). As amostras de sangue foram submetidas à lise celular com 1000 µL do Tampão Tris-1 (Tris-HCl 10mM pH=8,0, KCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, EDTA 2 mM pH=8,0) contendo Triton X-100 a 2,5%. Após centrifugação, os núcleos celulares foram lisados com 220 µL do tampão Tris-2 (Tris-HCl 10 mM pH=8,0, KCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, EDTA 2 mM pH=8,0, NaCl 0,4 M) contendo SDS a 1%. As proteínas foram removidas por precipitação salina com 100 µL de NaCl 5 M. O DNA presente no sobrenadante foi isolado e purificado por precipitação etanólica e finalmente re-suspenso em 100 µL do tampão TE (Tris-HCl 10 mM e 1 mM EDTA, pH=8,0) e mantido a -20°C. A integridade das amostras de DNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo, e digitalizado em sistema de análise de imagem. A quantificação e análise de pureza das amostras de DNA extraídos foram realizadas por espectrofotometria em UV após diluição (1:20) das amostras em tampão TE (Sambrook *et al.*, 1989).

Para avaliação da extração e existência de inibidores da PCR, o DNA extraído dos tecidos foi submetido à amplificação do gene constitutivo humano, protrombina. Nos casos em que as amostras foram negativas na PCR do gene da protrombina, essas foram re-extraídas a partir de nova alíquota de sangue periférico.

#### **3.3.5. Pesquisa do DNA do agente infeccioso**

A identificação dos agentes infecciosos foi feita a partir do material genético extraído dos materiais biológicos: placa de aterosclerose da endarterectomia, artéria coronária do coração nativo de transplantado cardíaco e sangue periférico, através de amplificação pela PCR de regiões específicas do DNA genômico destes agentes patogênicos.

Para a identificação da *Chlamydia pneumoniae*, os oligonucleotídeos iniciadores e o protocolo de PCR foram padronizados em nosso laboratório, baseados no método descrito por Gaydos *et al.* (1992), com modificações, sendo o volume final de reação de 50  $\mu$ L. Pipetou-se o tampão da PCR (Tris-HCl a 10 mmol/L, pH 9,0, KCl a 50 mmol/L, MgCl<sub>2</sub> a 2,0 mmol/L) com 400  $\mu$ M de cada deoxinucleotídeo (dNTPs), 200 nM de cada iniciador, 1,0 U de *Taq* DNA polimerase e 2  $\mu$ L do DNA genômico, acertando-se o volume com água MilliQ esteril. A reação de amplificação foi realizada com programa de: incubação inicial de 98°C por 3 min, 35 ciclos de 1 min a 95°C, 2 min a 60°C e 1 min a 72°C, e polimerização final de 10 min a 72°C. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados correspondem aos resíduos 8502-8517 e 8811-8826 da seqüência AE001668 [gi:4377192] (BLAST), do gene 16S do RNA ribossomal, espécie específico da *C. pneumoniae*.

Para a identificação da *Helicobacter pylori*, foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores baseados no método descritos por Hammar *et al.* (1992), com modificações, sendo volume final de reação de 50  $\mu$ L. Pipetou-se o tampão da PCR (Tris-HCl a 10 mmol/L, pH 9,0, KCl a 50 mmol/L, MgCl<sub>2</sub> a 2,0 mmol/L) com 400  $\mu$ M de cada deoxinucleotídeo (dNTPs), 200 nM de cada iniciador, 1,0 U de *Taq* DNA polimerase e 2  $\mu$ L do DNA genômico acertando-se o volume com água MilliQ esteril. A amplificação foi realizada com programa de: incubação inicial de 98°C por 3 min, 30 ciclos de 1 min a 95°C, 2 min a 55°C e 1 min a 72°C, e polimerização final de 10 min a 72°C. Os oligonucleotídeos utilizados correspondem aos resíduos de 1586 a 1601 e 1874 a 1888 da seqüência AE001569 [gi:4156095] (BLAST), do gene da proteína antigênica SSA de 26 kDa, espécie-específica do *H. pylori*.

Para a identificação do citomegalovírus, foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores baseados no método descrito por Jahan *et al.* (1989), com modificações, sendo o volume final de reação de 50  $\mu$ L em tampão da PCR (Tris-HCl a 10 mmol/L, pH 9,0, KCl a 50 mmol/L, MgCl<sub>2</sub> a 2,0 mmol/L) com 400  $\mu$ M de cada deoxinucleotídeo (dNTPs), 200 nM de cada iniciador, 1,0 U de *Taq* DNA polimerase e 2  $\mu$ L do DNA genômico, acertando-se o volume com água MilliQ esteril. A amplificação foi realizada com programa de: incubação inicial de 98°C por 3 min, 35 ciclos de 1 min a 95°C, 2 min a 57°C e 1 min a 72°C, e polimerização final de 10 min a 72°C. Os oligonucleotídeos utilizados correspondem aos resíduos de 331 a 345 e 485 a 501 da seqüência S58171

[gi:299092] (*BLAST*), do gene que codifica para proteína de produção imediata (*immediate early genomes E2*), região espécie-específica do citomegalovírus humano.

Todos os DNAs extraídos foram testados para avaliar possíveis inibidores da PCR através da PCR do gene constitutivo humano protrombina. Os oligonucleotídeos iniciadores e o protocolo da PCR foram padronizados em nosso laboratório e baseados no métodos de Poort *et al.*, 1996), sendo volume final da reação de 50 $\mu$ L. Pipetou-se tampão da PCR (Tris-HCl a 10 mmol/L, pH 9,0, KCl a 50 mmol/L, MgCl<sub>2</sub> a 1,5 mmol/L) com 400  $\mu$ M cada de deoxinucleotídeos (dNTPs), 200 nM de cada iniciador, 1,0 U de *Taq* DNA polimerase e 2  $\mu$ L do DNA genômico, acertando-se o volume com água MilliQ esteril. A amplificação foi realizada com programa de: incubação inicial de 98°C por 3 min, 30 ciclos de 1 min a 95°C, 2 min a 70°C e 1 min a 72°C, e polimerização final de 10 min a 72°C. O produto final amplificado possui 479 pb.

### 3.3.6. Controle de qualidade da PCR qualitativa

#### 3.3.6.1. Construção dos controles internos

Os controles internos para a PCR foram construídos a partir das regiões gênicas selecionadas para a amplificação, utilizando os mesmos iniciadores. Às extremidades 5' de cada seqüência de oligonucleotídeos iniciadores para detecção dos agentes infecciosos estudados foram inseridas seqüências de oligonucleotídeos para o reconhecimento das enzimas de restrição *EcoRI* (*sense*) e *BamH I* (*antisense*), para clonagem sítio-dirigida no plasmídeo Bluescript II KS<sup>-</sup> (Stratagene, USA).

As amostras de DNA dos agentes infecciosos obtidos, segundo descrito no item anterior (3.3.4), foram submetidos à amplificação pela PCR utilizando-se os oligonucleotídeos modificados, permitindo a incorporação dos sítios das enzimas no produto amplificado. Em seguida, os produtos da PCR foram submetidos a novas amplificações com oligonucleotídeos internos modificados, produzindo deleções alvo específicas, de 50 a 80 pares de base de regiões internas dos respectivos genes (ver esquema abaixo, Fig. 1).



**Figura 1.** Esquema representativo da metodologia utilizada para produção da deleção para obtenção de controles internos da PCR quantitativa. Primeiramente, realiza-se amplificação com os oligonucleotídeos 1-3 e 2-4, separadamente. O oligonucleotídeo 3 é complementar à fita "sense" e possui uma pequena extensão na região 5' complementar a fita "anti-sense". O oligonucleotídeo 4 é complementar à fita "anti-sense" e possui uma pequena extensão, na região 5', complementar a fita "sense", produzindo uma deleção programada de determinado número de bases. Na última fase, o produto de cada amplificação (1-3 e 2-4) é adicionado juntamente e amplificado com os oligonucleotídeos externos (1 e 2).

A amplificação da região gênica construída com os oligonucleotídeos 1 e 2 (controle interno) resulta em um produto da PCR menor que o molde original (do agente a ser pesquisado), podendo ser diferenciados através de gel de eletroforese, com visualização das bandas por brometo de etídio sob luz ultra-violeta.

Para *C. pneumoniae*, o fragmento original possui 331 pb, e o clonado, 256 pb; para *H. pylori*, o fragmento original possui 320 pb, e o clonado, 258 pb; para o citomegalovírus, o fragmento original possui 188 pb, e o clonado; 147 pb. Os oligonucleotídeos foram analisados pelos programas *BLAST*, *DNAclub*, *Clone*, *Oligo* e *Williamstone*.

### 3.3.6.2. Extração do plasmídeo

O plasmídeo pBLUESCRIPT II KS<sup>-</sup> obtido da Stratagene, foi transfectado em *E. coli* DH5  $\alpha$ , utilizando o método de cloreto de cálcio (Sambrook et al, 2001) e selecionado em meio LB ágar contendo 100  $\mu$ g/ml de ampicilina. As bactérias transformadas foram selecionadas e avaliadas para serem expandidas.

Partindo-se de uma colônia isolada e carreadora do plasmídeo pBLUESCRIPT KS<sup>-</sup>, incubada em 5 mL de meio líquido de LB com antibiótico (100  $\mu$ g/mL) por uma noite a 37 °C com agitação, as colônias foram centrifugadas à 2.500 g, por 15 min; 4



mL do sobrenadante foram removidos e o restante, ressuspenso e transferido para tubo de 1,5 mL. O tubo eppendorf foi novamente centrifugado à 12.000 g por 30 segundos e o sobrenadante, removido. O sedimento foi utilizado para extração dos plasmídeos de acordo com o protocolo de orientação do kit de extração *FlexiPrep*. Resumidamente, o *pellet* foi re-suspenso em 200 µL de solução I, agitado vigorosamente e adicionados 200 µL de solução II. O tubo eppendorf foi invertido algumas vezes. Acrescentou-se 200 µL de solução III, também invertendo o tubo várias vezes. Centrifugou-se à 12.000 g por 5 min à temperatura ambiente. Cuidadosamente, foi transferido o sobrenadante para um novo tubo eppendorf. Foram acrescentados 420 µL (0,7 volume) de isopropanol à temperatura ambiente e agitado vigorosamente e mantido em repouso a temperatura ambiente por 10 min e centrifugado à 12.000 g por 10 min. O sobrenadante foi removido por aspiração e o tubo, invertido por alguns minutos para secar. O *pellet* foi re-suspenso em 150 µL de Sephaglas FO, centrifugado por 15 segundos à 12.000 g. O sobrenadante foi removido cuidadosamente, sem perturbar o *pellet*. Foram acrescentados 200 µL de tampão de lavagem e agitado vigorosamente. Centrifugado por 15 segundos, o sobrenadante foi removido. 300 µL de etanol 70% foram adicionados e agitado vigorosamente. Centrifugado por 15 segundos a 12.000 g e o sobrenadante removido; o precipitado foi mantido em repouso à temperatura ambiente por 10 min para secar. O *pellet* foi ressuspenso em 50 µL de Tampão Tris-EDTA, 10 mM pH 8,0, incubado por 5 min à temperatura ambiente, centrifugado à 12.000 g por 1 min. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo eppendorf e mantido a -20°C.

### **3.3.6.3. Restrição enzimática do plasmídeo e do fragmento dos genes obtidos pela PCR**

O plasmídeo utilizado pBLUESCRIPT KS<sup>+</sup> e o produto final dos genes amplificados foram submetidos a digestão, com as enzimas *EcoRI* e *BamH I*, a 37°C por 2 horas, e purificados através de coluna de gel de exclusão. Os produtos da digestão enzimática foram purificados de acordo com o protocolo do “kit” *Concert™ Gel Extraction System*.

#### 3.3.6.4. Reação de ligação

O fragmento de gene amplificado pela PCR do agente infeccioso e o DNA plasmidial linearizado, tratados adequadamente com as enzimas de restrição e purificados, foram submetidos à reação de ligação (clonagem) pela adição da enzima T4 DNA ligase, em tampão contendo 67mM de Tris-HCl, pH 7,8, 6,7mM de MgCl<sub>2</sub>, 10mM ditioneitol (DTT) e 66μM adenosina trifostato (ATP), sendo incubados à temperatura de 16°C por 16h. O produto desta reação foi utilizado para transformação de *E. coli* DH5 α. Os plasmídeos recombinantes foram denominados para *C. pneumoniae* de *pBluescriptCpndel*, para CMV de *pBluescriptCMVdel* e para *H. pylori* de *pBluescriptHpdel*.

#### 3.3.6.5. Preparação das bactérias competentes

A partir de uma colônia isolada de bactéria *E. coli* cepa DH-5α, foi realizado repique para a expansão, utilizando meio líquido de LB sem antibiótico, incubando-se sob agitação à temperatura de 37 °C, até a obtenção de uma densidade óptica (DO) de 600 nm. A suspensão resultante foi centrifugada, o sobrenadante, desprezado e as células, decantadas. Em seguida, o material foi tratado com solução de cloreto de cálcio 50 mM gelado por 30 min e centrifugado à 4000 g por 5 min. Ressuspendeu-se novamente as células em solução de cloreto de cálcio 50 mM e 5% de DMSO. As células foram conservadas à temperatura de -70 °C até o momento da transformação.

#### 3.3.6.6. Transformação da *E.coli* com o plasmídeo recombinante

Para a transformação, foram utilizados 100 μL de suspensão de bactérias (células competentes) e 1, 2 ou 3 μL de produto da reação de ligação do item 3.3.6.4 (plasmídeo clonado). A mistura foi homogeneizada e incubada por 5 min em banho de gelo, seguido por 90 segundos a 42 °C, e novamente em banho de gelo por mais 5 min. Foi adicionado, então, 1 mL de meio SOC e incubado a 37 °C por 5 min sem agitação, seguido por 60 min com agitação e semeado em meio de cultura LB ágar contendo ampicilina (200 μg/mL), incubando a 37 °C por 1 noite.

As colônias que cresceram neste período foram submetidas à extração do plasmídeo, como descrito no item 3.3.6.2 e submetidas à restrição enzimática com as mesmas enzimas utilizadas para clonagem e analisadas por eletroforese em gel de agarose a 1% para confirmação da presença do fragmento clonado, para cada agente infeccioso. Foram quantificadas por espectrofotometria em UV, calculadas quanto à concentração Molar e utilizadas como controle interno.

### 3.3.7. Análise do controle interno na PCR qualitativa

A partir do peso molecular conhecido do plasmídeo recombinado e de sua quantificação por espectrofotometria em UV e após diluição das amostras em tampão TE, foi determinado o número de cópias do DNA alvo. Treze diluições seriadas de concentrações conhecidas foram realizadas com o plasmídeo recombinante.

Uma vez determinado o limite de detecção, todas as amostras foram amplificadas juntamente com o controle interno correspondente à menor concentração a ser detectada pela PCR.

As amostras negativas para a presença do agente infeccioso apresentaram apenas uma banda referente ao controle interno. Uma amostra contendo apenas os reagentes foi analisada juntamente com amostras para controle dos reagentes e contaminações.

Os produtos amplificados (DNA da amostra e controle interno) foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%, em tampão TBE (Tris-HCl a 0,45 mM, ácido bórico a 0,45 mM, e EDTA a 2,5 mM, pH8,0) (Sambrook *et al.*, 1989) e foram diferenciados, sob luz ultravioleta, pelos tamanhos, refletidos na distância de migração e comparados com uma referencia (ladder de 100 bp, Invitrogen, USA). O gel foi fotografado e documentado.

### 3.3.8. Expressão gênica do CD40L

A expressão do RNAm do CD40L foi determinada por RT-PCR do RNA total extraído de 50 a 100 mg de tecido. O RNA total foi isolado dos tecidos, utilizando-se o TRIzol, baseado no método de Chomczynski *et al.* (1987). O RNA total foi quantificado por espectrofotometria a 260 nm.

Para a análise da expressão gênica do CD40L (CD154), o cDNA total foi amplificado pela PCR, segundo o protocolo modificado descrito por Schattner *et al.* (1998), sendo volume final de reação de 50  $\mu$ L. O tampão da PCR foi pipetado (Tris-HCl a 10 mmol/L, pH 9,0, KCl a 50 mmol/L, MgCl<sub>2</sub> a 2,0 mmol/L) com 400  $\mu$ M cada de deoxinucleotídeo (dNTPs), 200 nM de cada iniciador, 1,0 U de *Taq* DNA polimerase e 2  $\mu$ L de cDNA, acertando o volume final com água milli Q. A amplificação foi realizada com o programa: incubação inicial de 98°C por 3 min, 40 ciclos de 1 min a 95°C, 2 min a 58°C e 1 min a 72°C, e polimerização final de 10 min a 72°C. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados correspondem aos nucleotídeos 677-657 e 402-422 do cDNA do CD40L, gi: 4557432 (NM\_000074.1), com um produto de 276 pb.

A amplificação do cDNA da enzima gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foi realizada simultaneamente para normatização, permitindo o cálculo da expressão relativa; esse gene é utilizado por ser expresso de forma constitutiva em todas as células de mamíferos (Nudel *et al.*, 1983, Schattner *et al.*, 1998, Sugimoto *et al.*, 1999). Os oligonucleotídeos iniciadores foram descritos por Tokunaga, *et al.*, 1987 e flanqueiam um fragmento correspondente a um produto de amplificação de 452 pb.

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%, em tampão TBE (Tris-HCl a 0,45mM, ácido bórico a 0,45 mM, e EDTA a 2,5 mM, pH8,0) (Sambrook *et al.*, 1989), corado com brometo de etídeo. O gel foi visualizado sob luz ultravioleta e foto-documentado.

A quantificação do produtos da PCR foi realizada através do kit *LabChip* para análise de fragmentos de DNA de até 500 pb pelo sistema *Agilent 2100 Bioanalyzer*. Utilizando-se um padrão de tamanho de fragmentos e concentração, as amostras foram quantificadas pela medida da área sob a curva, correspondente ao tamanho dos fragmentos esperados para CD40L e GAPDH.

### 3.3.9. Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados através do programa SigmaStat para Windows, versão 1,0 (Sigma Chemical, Co., St Louis, MO, EUA).

Para a análise da hipótese de igualdade de duas médias foi utilizado o teste *t* de Student. Para a comparação de mais de duas médias, foi utilizada a Análise da

Variância com um único fator. Para comparação entre grupos com distribuição não normal, foram utilizados os testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis. As comparações múltiplas foram analisadas pelo teste de Turkey. A comparação entre proporções foi avaliada através do teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ) ou teste exato de Fisher (Rosner, 1986).

O nível de significância considerado para os testes foi de  $p < 0,05$ .

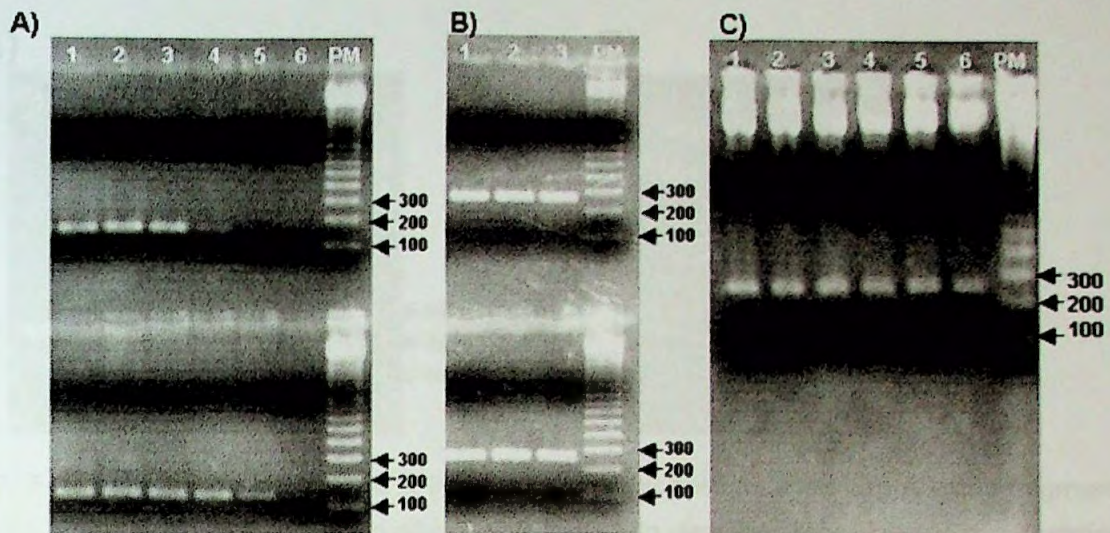
## 4. RESULTADOS

### 4.1 Construção dos controles internos e padronização da PCR

#### 4.1.1. *Chlamydia pneumoniae*

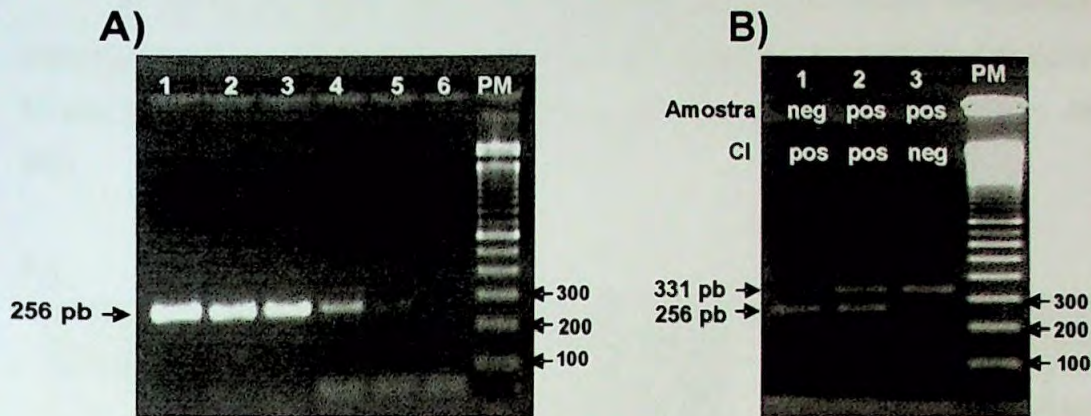
Na figura 1 estão ilustrados os resultados das PCRs, avaliando-se várias temperaturas de hibridação (Fig 1A). Na parte superior do gel A estão demonstrados os produtos obtidos na amplificação utilizando-se os iniciadores 1 e 3 e na parte inferior, os iniciadores 2 e 4. O painel B mostra o produto da PCR com iniciadores 1 e 2, utilizando-se como molde a mistura dos produtos 1 com 3 e 2 com 4, na parte superior e inferior do gel. O painel C ilustra o resultado do produto de digestão com as enzimas *Eco* RI e *Bam* HI, dos plasmídeos recombinantes *pBluescriptCpndel*.

Os fragmentos obtidos da digestão enzimática por *Eco* RI e *Bam* HI dos plasmídeos recombinantes extraídos, confirmaram a inserção do fragmento de DNA de *C. pneumoniae*, com tamanho de 256 pb.



**Figura 1.** Fotografia do gel de eletroforese em agarose a 1,5%, corado com brometo de etídio. Em A estão produtos da PCR com várias temperaturas de hibridização (**gradiente de A1 (56°C), A2 (57,1°C), A3 (58,7°C), A4 (60,6°C), A5 (62,8°C), A6 (66°C)**). A parte superior do gel mostra os produtos gerados pelos iniciadores 1 e 3 (142 pb) e a parte inferior, os produtos gerados pelos iniciadores 2 e 4 (125 pb); em B está o controle interno gerado pela PCR utilizando como moldes os produtos de 1x3 e 2x4, produzindo um fragmento com deleção de 75 pb, constituído por 256pb. O painel em C ilustra, nas posições 1, 2, 3, 4, 5, 6, produtos de restrição enzimática, com *EcoRI* e *BamHI*, dos plasmídeos recombinantes isolados de algumas colônias de bactérias transformadas. PM corresponde ao padrão de pares de base de DNA de 100 pb.

A figura 2 permite a visualização do limite de detecção da PCR para o fragmento gênico denominado plasmídeo recombinante *pBluescriptCpndel*. O menor número de cópias do plasmídeo recombinante para *C. pneumoniae* que, após amplificação ainda pôde ser visualizada, foi de  $1,1 \times 10^2$  cópias/ $\mu\text{L}$ .



**Figura 2.** Fotografia do gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio. Em **A** estão fragmentos obtidos dos produtos de PCR, utilizando diluições crescentes do plasmídeo recombinante com fragmento de *C. pneumoniae*. Linhas: 1, 2, 3, 4, 5, 6: correspondem aos números de cópias/ $\mu$ L  $1,1 \times 10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ ,  $10^1$ , respectivamente. O painel **B** representa os padrões de resultados encontrados nas análises das amostras na linha 1, amostra negativa com controle interno; linha 2, amostra positiva com controle interno; linha 3, amostra positiva sem controle interno. **PM** corresponde ao padrão de pares de base de DNA de 100 pb.

A figura 2B, mostra o padrão de resposta encontrado na análise das amostras: amostra negativa com controle interno (B linha 1), amostra positiva com controle interno (B linha 2) e amostra positiva sem controle interno (B linha 3).

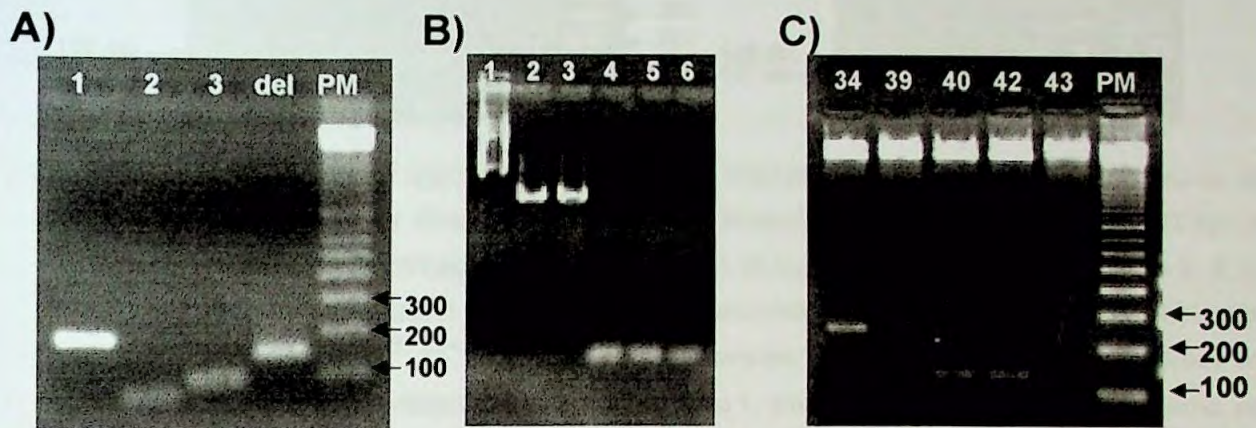
#### 4.1.2. Citomegalovírus

Na figura 3, painel A, estão ilustrados as fases para a construção do controle interno: o produto da amplificação do DNA extraído da cultura padrão de CMV, utilizando-se os iniciadores externos 1 e 2, os fragmentos internos gerados pela utilização dos iniciadores 1 com 3 e 2 com 4, e o fragmento recombinante a partir da amplificação da mistura dos fragmentos menores com iniciadores externos.

No painel B da figura 3 está representado o plasmídeo circular, na linha 1, o plasmídeo linear, digerido pelas enzimas *Eco* RI e *Bam* HI, nas linhas 2 e 3, e os fragmentos de DNA prontos para clonagem, também digeridos pelas enzimas, nas linhas 4 e 5.



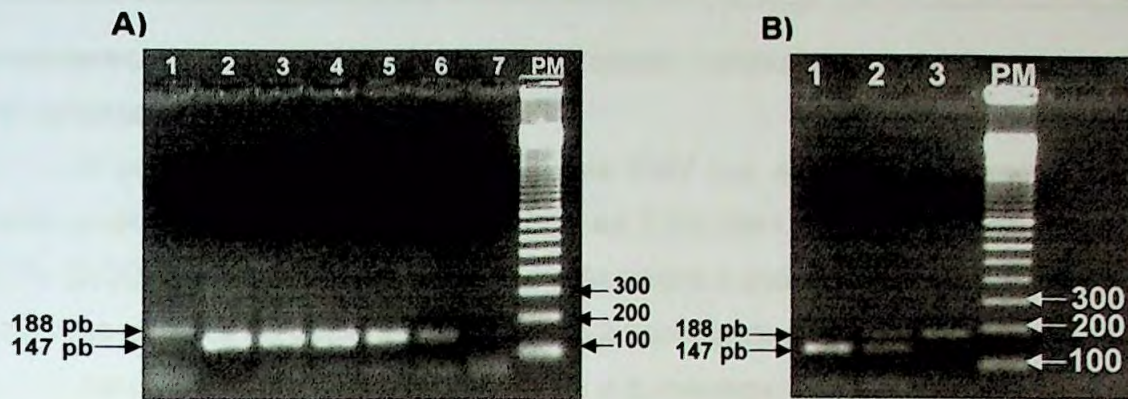
A restrição enzimática dos plasmídeos recombinantes selecionados, com as enzimas *Eco* RI e *Bam* HI, mostrou que os plasmídeos extraídos das colônias 40 e 42 foram bem sucedidos, confirmando o fragmento originalmente clonado de 147pb (Fig 3C).



**Figura 3.** Fotografia do gel de eletroforese em agarose a 1,5%, corado com brometo de etídio, mostra, em **A**, os produtos de PCR derivados do método de deleção sítio dirigida para CMV. A linha 1 representa o fragmento gerado pela amplificação do DNA da cepa padrão de CMV (188pb). As linhas 2 e 3 representam os fragmentos produzidos pelos iniciadores 1 com 3 e 2 com 4, constituídos por 65 e 82 pb, respectivamente, **del** mostra produto da PCR utilizando-se como molde a mistura dos produtos das PCR anteriores, um fragmento de 147pb. O painel **B** mostra em 1 plasmídeo não digerido, em 2 e 3 o plasmídeo cortado com *Eco*RI e *Bam*HI, em 4, 5 e 6 produto de PCR a ser clonado, digerido com as duas enzimas. O painel **C** mostra a restrição enzimática, com *Eco*RI e *Bam*HI, dos plasmídeos recombinantes isolados de algumas colônias transformadas (34, 39, 40, 42 e 43). PM corresponde ao padrão de pares de base de DNA de 100 pb.

Foram selecionados 4 clones, que foram expandidos e congelados em nitrogênio líquido para armazenamento das bactérias transformadas (estoque).

Na figura 4 pode ser visualizado o limite de detecção da PCR do fragmento gênico denominado como plasmídeo recombinante *pBluescriptCMVdel*. O menor número de cópias do plasmídeo recombinante para CMV que, após amplificação, ainda pôde ser visualizada, foi de  $1,3 \times 10^3$  cópias/ $\mu$ L.



**Figura 4.** Fotografia do gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio. No painel **A** observa-se os produtos de PCR gerados por diluições crescentes do *pBluescriptCMVdel*, com exclusão de 41 bp. A linha 1 mostra produto da amplificação de amostra de DNA de cultura padrão de CMV, as linhas 2, 3, 4, 5, 6 e 7 correspondem ao produto da amplificação das diluições seriadas do plasmídeo recombinante  $1,3 \times 10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  cópias/ $\mu\text{L}$ , respectivamente. O painel **B** representa os padrões de resultados encontrados nas análises das amostras: na linha 1, amostra negativa com controle interno, na linha 2, amostra positiva com controle interno, na linha 3, amostra positiva sem controle interno. **PM** corresponde ao padrão de pares de base de DNA de 100 pb.

A figura 4B, mostra o padrão de resposta encontrado na análise das amostras: amostra negativa com controle interno (B linha 1), amostra positiva com controle interno (B linha 2) e amostra positiva sem controle interno (B linha 3).

#### 4.2. Pesquisa dos agentes infecciosos em amostras de sangue pela PCR

Foram avaliadas as frequências de positividade para os agentes infecciosos em sangue periférico, pela PCR, em 41/48 (85,4%) do total das amostras do estudo, sendo 30/37 (81,0%) de pacientes que foram submetidos a endarterectomia durante a cirurgia de revascularização do miocárdio e 11 (100%) dos pacientes submetidos a transplante cardíaco.

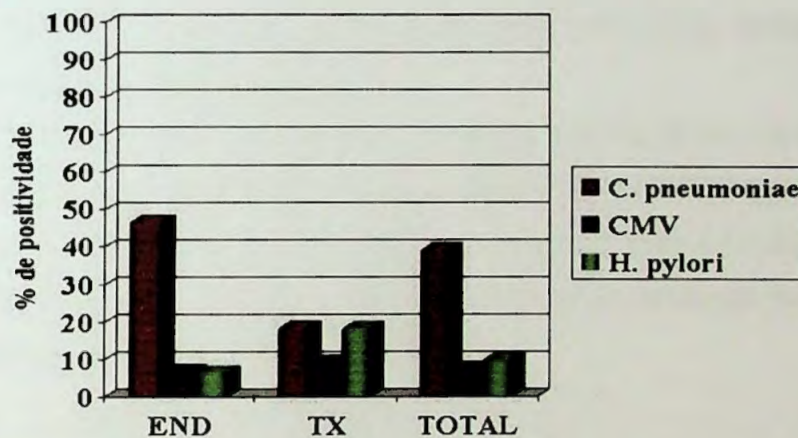
Todas as amostras analisadas apresentaram boa pureza, medida através da relação espectrofotométrica 260/280 nm, entre 1,7 e 2,0, e concentração entre 50 e 500 ng/ $\mu\text{L}$  de DNA.

Na figura 5 observa-se que a porcentagem de positividade para *C. pneumoniae*, nas amostras de sangue periférico analisadas pela PCR, foi de 39,0% (16/41) no total das amostras, sendo 46,6% (14/30) em amostras de pacientes submetidos a

endarterectomia e 18,2% (2/11) em amostras obtidas de pacientes submetidos a transplante cardíaco (Fig.5).

A porcentagem de positividade para CMV nas amostras de sangue periférico, como pode ser observado na figura 5, foi de 7,3% (3/41) no total das amostras, sendo 6,7% (2/30) em amostras de pacientes submetidos a endarterectomia e 9,1% (1/11) em amostras obtidas de pacientes submetidos a transplante cardíaco (Fig.5).

Ainda na figura 5 está representada a porcentagem de positividade para *H. pylori* nas amostras de sangue periférico. No total das amostras, foi observada positividade em 9,8% (4/41) do total das amostras, sendo 6,6% (2/30) em amostras de pacientes submetidos a endarterectomia e 18,2% (2/11) em amostras de pacientes transplantados cardíacos (Fig.5).



**Figura 5.** Gráfico de barras representando a porcentagem de positividade para *C. pneumoniae*, CMV e *H. pylori* em amostras de sangue periférico, somente nas amostras obtidas por endarterectomia (END), somente para amostras obtidas de transplantados cardíacos (TX) e no total das amostras (TOTAL).\* *C. pneumoniae* no sangue periférico entre END e TX, Teste Exato de Fisher  $p=0,152$ , CMV no sangue periférico entre END e TX, Teste Exato de Fisher  $p=1,00$ , *H. pylori* no sangue periférico entre END e TX, Teste Exato de Fisher  $p=1,00$ .

#### 4.3. Pesquisa dos agentes infecciosos em amostras de tecido arterial coronariano

As amostras de tecido obtidas por endarterectomia apresentaram tamanhos bastante variados, por isso as maiores foram divididas em 2 ou até 3 partes. As amostras obtidas de coronárias de coração nativo de pacientes submetidos a transplante cardíaco, doravante designados apenas como "transplantados" foram

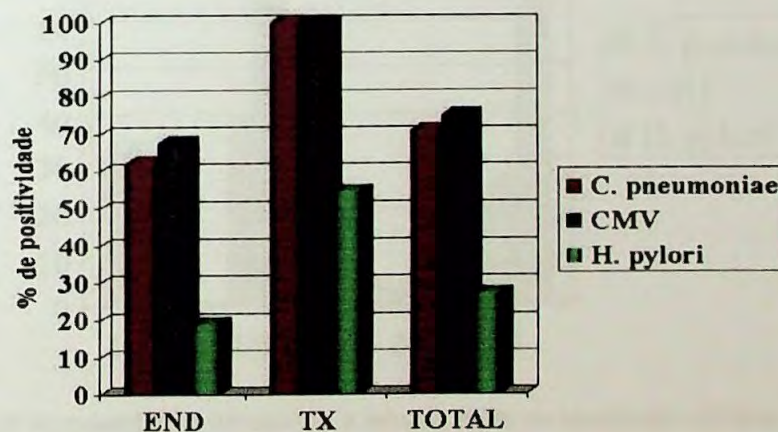
sempre abundantes sendo divididas em 3 ou 4 partes. Algumas amostras de coronárias de “transplantados” apresentaram evidências de aterosclerose identificadas pela análise histológica.

Todas as amostras analisadas apresentaram pureza medida através da relação espectrofotométrica 230/280 nm, entre 1,4 e 1,8, e concentração entre 50 e 500 ng/ $\mu$ L de DNA. As amostras mais concentradas foram diluídas para obtenção de valores de concentração inferiores a 200 ng/ $\mu$ L. As amostras que não amplificaram o controle interno, foram diluídas (1:10) e a PCR foi repetida, para eliminar a possibilidade de inibidores.

Nas placas de ateroma obtidas da endarterectomia, a porcentagem de pacientes com amostras positivas para os agentes infecciosos, foi de 62,2% (23/37), 67,6% (25/37) e 18,9% (7/37) para *C. pneumoniae*, CMV e *H. pylori*, respectivamente, como pode ser observado na figura 6 (Fig.6).

Nos pacientes do grupo de transplantados, a positividade, foi de 100,0% (11/11) para *C. pneumoniae*, 100,0% (11/11) para CMV e 54,5% (6/11) para *H. pylori* (Fig.6).

A análise do total de amostras mostrou que 70,8% (34/48), 75,0% (36/48) e 27,1% (13/48) do pacientes estudados tiveram amostras positivas para *C. pneumoniae*, CMV e *H. pylori*, respectivamente (Fig.6).



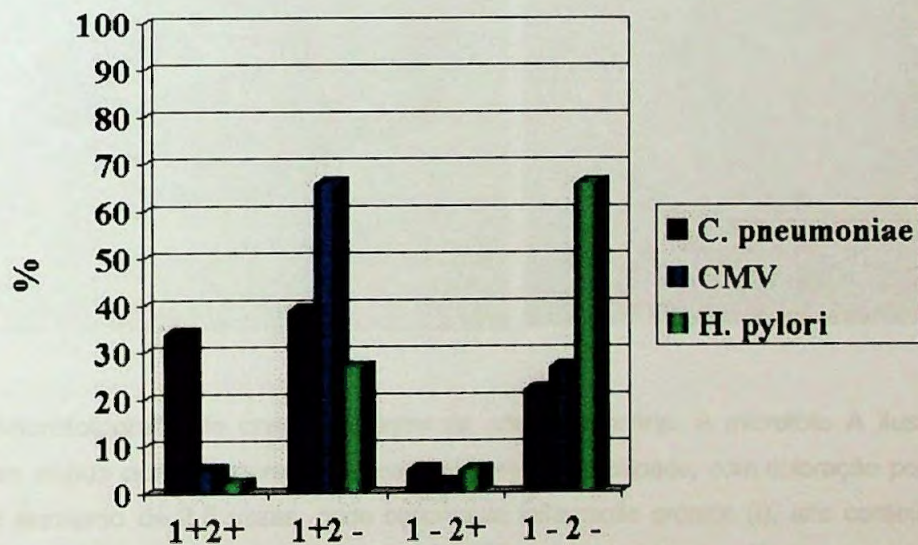
**Figura 6.** Gráfico representativo da porcentagem de pacientes positivos (em pelo menos uma das partes de cada amostra) para *C. pneumoniae*, CMV e *H. pylori* em amostras de tecido pela PCR, somente nos produtos da endarterectomias (END), somente para amostras de “transplantados” (TX) e no total das amostras (TOTAL). \* Porcentagem de positividade para *C. pneumoniae* entre END e TX, Teste Exato de Fisher  $p=0,021$ , para CMV entre END e TX, Teste Exato de Fisher  $p=0,486$ , para *H. pylori* entre END e TX, Teste Exato de Fisher  $p=0,017$ .

#### 4.4. Correlação entre positividade no tecido e no sangue periférico pela PCR

A figura 7 ilustra a análise de correlação entre a positividade para os agentes infecciosos no sangue e no tecido do total das amostras (END+TX).

Os pacientes que tiveram amostras positivas, tanto no tecido como no sangue periférico foram 34,1%(14/41) para *C. pneumoniae*, 4,9% (2/41) para CMV, e 2,4% (2/41) para *H. pylori*. Os pacientes que tiveram amostras positivas no tecido, mas negativas no sangue periférico, foram 39,0%(16/41) para *C. pneumoniae*, 65,9% (27/41) para CMV e 26,8% (11/41) para *H. pylori* (Fig.7). Aqueles que apresentaram amostras negativas no tecido e positivas no sangue periférico foram 4,9%(2/41) para *C. pneumoniae*, 2,4% (1/41) para CMV e 4,9% (2/41) para *H. pylori* (Fig.7).

Os casos que apresentaram negatividade em ambas as amostras foram 22,0%(9/41) para *C. pneumoniae*, 26,8% (11/41) para CMV, e 65,9% (27/41) para *H. pylori* (Fig.7).

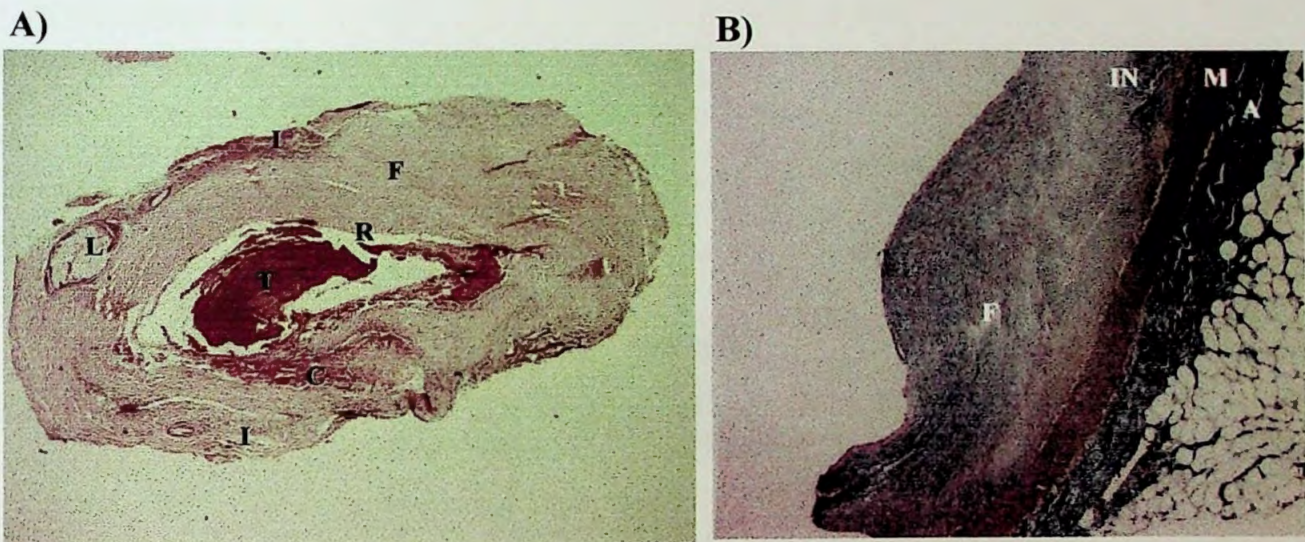


**Figura 7.** Gráfico representativo mostrando a relação entre os resultados obtidos pela PCR, em tecido (1) e em sangue periférico (2) para os agentes infecciosos nas amostras analisadas.

#### 4.5. Análise histopatológica

A análise morfológica das amostras teve como foco principal características definidas como indicativas de instabilidade da placa, segundo Shah, 2003. A figura 8A mostra um exemplo de amostra com placa aterosclerótica com características de instabilidade, onde podem ser observados alto conteúdo lipídico, muitas células inflamatórias, capa fibrosa reduzida, ruptura e trombose oclusiva.

Com esta abordagem foram definidos grupos com lesões “estáveis” histologicamente, placa aterosclerótica predominantemente fibrótica, com baixo conteúdo de lipídios e poucas células inflamatórias (Fig 8B).



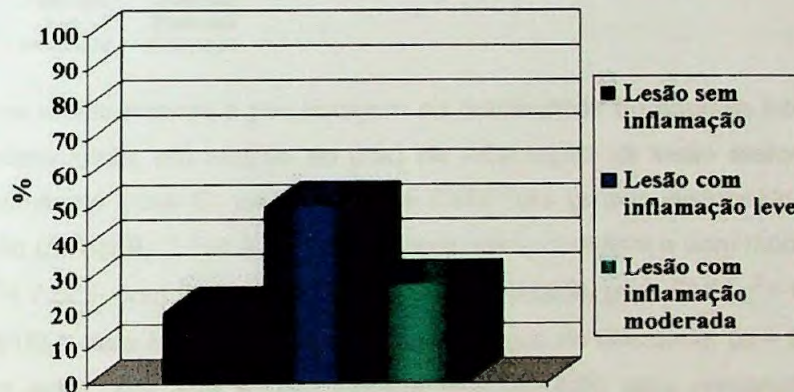
**Figura 8.** Microfotografia de corte histológico de artéria coronária. A microfotografia A ilustra a placa de aterosclerose obtida por endarterectomia, caracterizando instabilidade, com coloração por Hematoxilina-Eosina, em aumento de 2,5 vezes, onde observa-se inflamação crônica (I), alto conteúdo lipídico (L), cristais de colesterol (C), ruptura (R) e trombose oclusiva (T). Na microfotografia B observa-se a placa estável, corada com Tricômico-Masson, em aumento de 5 vezes, com predomínio de fibrose (F). (IN) representa a camada íntima, (M) representa a camada média e (A) representa a camada adventícia do vaso. Os cortes histológicos foram observados em lupa Zeiss Stmi SV6 e documentados por câmera semi-digital Sony XC003P acoplada ao programa para análise de imagem Qwin Leica.

#### 4.6. Análise histopatológica em relação à positividade para os agentes infecciosos

As amostras obtidas por endarterectomia, divididas em partes, foram distribuídas de acordo com a análise histopatológica, quanto à presença e grau de resposta inflamatória e presença de trombose, inflamação ou fibrose.

Do total das amostras, quatro, referentes aos dos pacientes submetidos a endarterectomia, não foram incluídas neste grupo.

Em relação à presença e grau de resposta inflamatória nas amostras obtidas de endarterectomias, 20,7% (11/53) apresentaram lesões sem indícios de inflamação, 50,9% (27/53) lesões com inflamação leve e 28,3% (15/53) lesões com inflamação moderada (Fig.9).



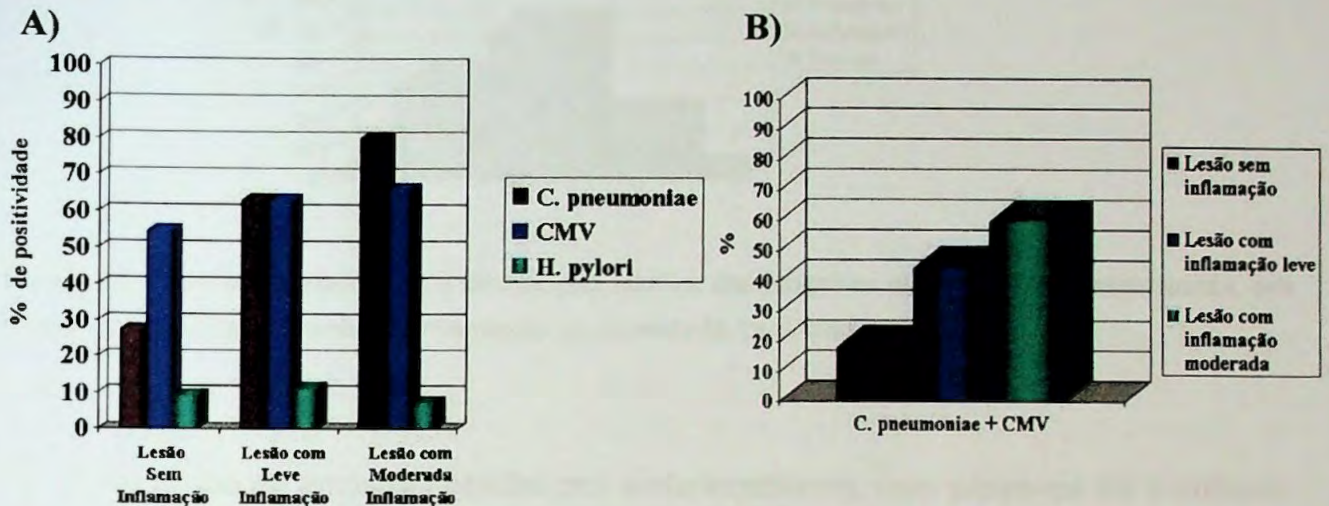
**Figura 9.** Gráfico representativo da distribuição de amostras obtidas por endarterectomia, em relação ao grau de inflamação da lesão aterosclerótica.

A porcentagem de positividade no grupo de amostras obtidas por endarterectomias, com a presença de lesões sem inflamação, foi de 27,3% (3/11) para *C. pneumoniae*, 54,5% (6/11) para CMV e 9,1% (1/11) para *H. pylori* (Fig.10A).

No grupo de amostras obtidas por endarterectomias, com lesão e processo inflamatório leve, a porcentagem de positividade pela PCR foi de 63,0% (17/27) para *C. pneumoniae*, 63,0% (17/27) para CMV e 11,1% (3/27) para *H. pylori* (Fig.10A).

Nas amostras com lesão e inflamação moderada, a porcentagem de positividade foi de 80,0% (12/15) para *C. pneumoniae*, 66,6% (10/15) para CMV e 7,3% (3/15) para *H. pylori* (Fig.10A).

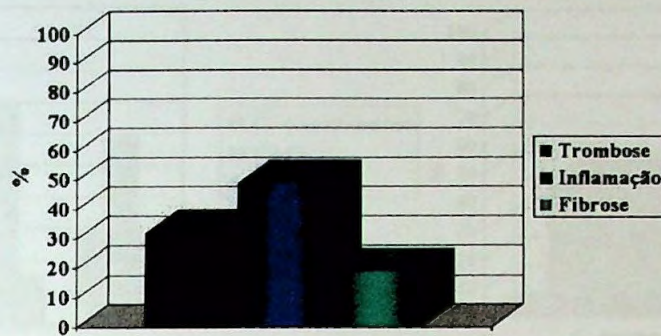
A positividade concomitante para *C. pneumoniae* e CMV, nas amostras de tecido obtidas por endarterectomia, foi observada em 18,2% (2/11) das lesões sem inflamação, 44,44% (12/27) das lesões com inflamação leve e 60% (9/15) das lesões com inflamação moderada (Fig10B).



**Figura 10.** Gráficos representando a porcentagem de positividade de agentes infecciosos em amostras obtidas por endarterectomia, em relação ao grau de inflamação na lesão aterosclerótica (painel A) e positividade concomitante para *C. pneumoniae* e CMV nos grupos distribuídos quanto ao grau de inflamação na lesão (painel B). \* Em A, entre os grupos sem, com leve e com moderada inflamação para *C. pneumoniae*  $\chi^2 = 7,529$ , com 2 graus de liberdade. ( $p = 0,023$ ), para CMV  $\chi^2 = 0,408$ , com 2 graus de liberdade. ( $p = 0,815$ ) e para *H. pylori*  $\chi^2 = 0,870$ , com 2 graus de liberdade. ( $p = 0,647$ ). Em B, entre os grupos com lesão sem, com leve e com moderada inflamação para presença concomitante de *C. pneumoniae* e CMV  $\chi^2 = 4,543$ , com 2 graus de liberdade, ( $p = 0,103$ ).

A figura 11 mostra a distribuição das amostras obtidas por endarterectomia, divididas quanto à presença de trombose, podendo ou não apresentar concomitantemente fibrose e indícios de inflamação, representaram 76,5% (17/53) do total; amostras com presença de indícios de inflamação, na ausência de trombose, e com ou sem fibrose representaram 49,1% (16/26) do total, e 18,9% (10/53) das amostras tiveram presença apenas de fibrose e/ou calcificação.





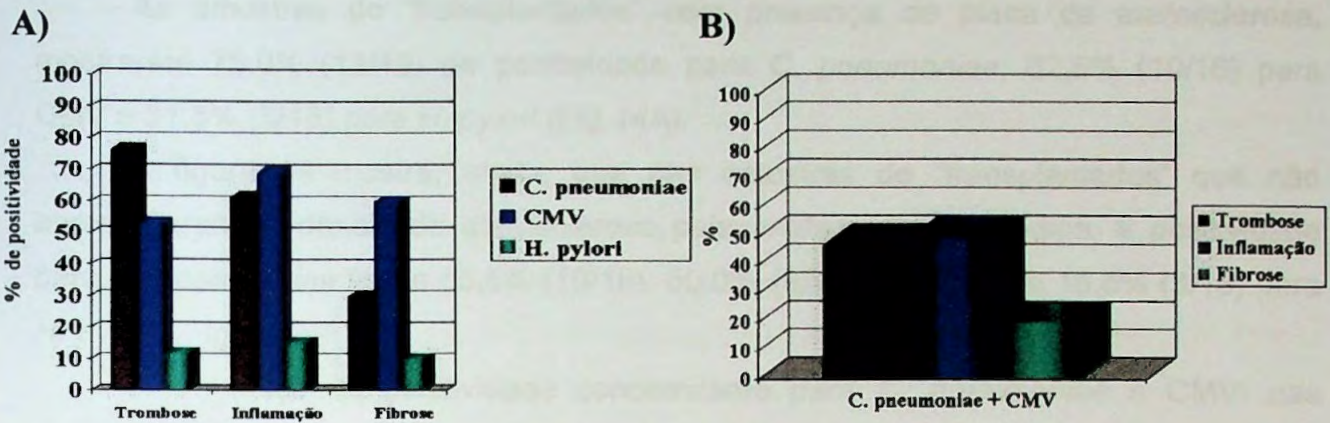
**Figura 11.** Gráfico representando a distribuição relativa das amostras obtidas por endarterectomia, em relação à presença de trombose, inflamação ou somente fibrose/calcificação.

No grupo de amostras obtidas por endarterectomia, com presença de trombose, foi observada positividade para *C. pneumoniae* em 76,5% (13/17) das amostras, para CMV em 52,9% (9/17) e para *H. pylori* em 11,8% (2/17) (Fig.12A).

No grupo de amostras obtidas por endarterectomia, que tiveram a presença de processo inflamatório, sem trombose, 61,5% (16/26), 69,2% (18/26) e 15,4% (4/26) das amostras foram positivas para *C. pneumoniae*, CMV e *H. pylori*, respectivamente (Fig.12A).

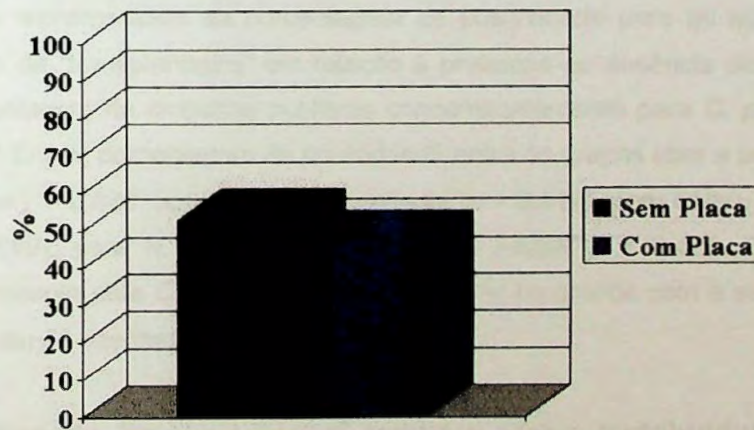
No grupo de amostras com fibrose e/ou calcificações, 30,0% (3/10) foram positivas para *C. pneumoniae*, 60,0% (6/10) para CMV e 10,0% (1/10) para, *H. pylori* (Fig12A).

A presença de positividade concomitante para *C. pneumoniae* e CMV nas amostras, foi de 47,1% (8/17) nas lesões com trombose, 50,0% (13/26) nas lesões com inflamação e 20% (2/10) nas lesões com fibrose e/ou calcificação (Fig.12B).



**Figura 12.** Gráficos representativos da porcentagem de positividade para os agentes infecciosos, pela PCR, nas amostras obtidas por endarterectomia, em relação à presença de trombose, inflamação sem trombose ou apenas fibrose e calcificação (painel **A**); e porcentagem de amostras positivas concomitantes para *C. pneumoniae* e CMV nos grupos (painel **B**). \* Em **A**, a porcentagem de positividade para *C. pneumoniae* nos grupos trombose, inflamação e fibrose,  $\chi^2 = 5,712$ , com 2 graus de liberdade, ( $p = 0,057$ ), para CMV  $\chi^2 = 1,188$ , com 2 graus de liberdade, ( $p = 0,552$ ), para *H. pylori*  $\chi^2 = 0,228$ , com 2 graus de liberdade, ( $p = 0,892$ ). Em **B**, para positividade concomitante para *C. pneumoniae* e CMV  $\chi^2 = 2,783$ , com 2 graus de liberdade, ( $p = 0,249$ ).

Entre as amostras obtidas de "transplantados", 47,1% (16/34) apresentaram placa de aterosclerose, identificadas pelo exame histopatológico (Fig.13).

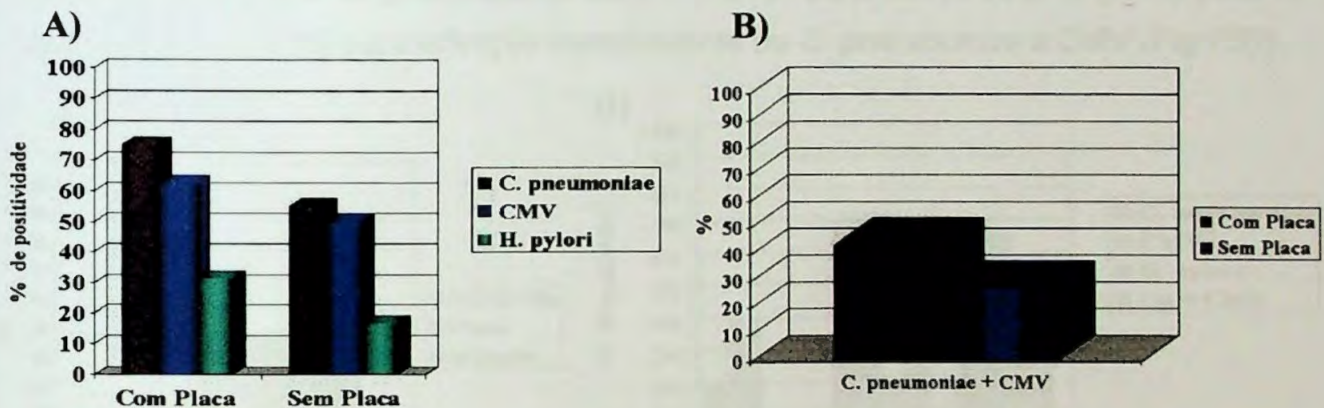


**Figura 13.** Gráfico representando a distribuição percentual das amostras de "transplantados" com ou sem placa de aterosclerose.

As amostras de "transplantados" com presença de placa de aterosclerose, mostraram 75,0% (12/16) de positividade para *C. pneumoniae*, 62,5% (10/16) para CMV e 31,3% (5/16) para *H. pylori* (Fig.14A).

A figura 14 mostra, ainda, que nas amostras de "transplantados" que não apresentaram evidência de aterosclerose pela análise histopatológica, a positividade para *C. pneumoniae* foi de 55,5% (10/18), 50,0% (9/18) para CMV e 16,6% (3/18) para *H. pylori*. (Fig.14A).

A presença de positividade concomitante para *C. pneumoniae* e CMV, nas amostras de "transplantados" foi de 43,7% (7/16) nas amostras com placa de aterosclerose e 27,7% (5/18) nas amostras com ausência de aterosclerose (Fig.14B).



**Figura 14.** Gráfico representativo da porcentagem de positividade para os agentes infecciosos, pela PCR, nas amostras de "transplantados" em relação à presença ou ausência de placa de aterosclerose (painel A), e porcentagem de amostras positivas concomitantemente para *C. pneumoniae* e CMV nos grupos (painel B). \* Em A, porcentagem de positividade entre os grupos com e sem placa aterosclerótica para *C. pneumoniae*  $\chi^2 = 0,680$ , com 1 grau de liberdade, ( $p = 0,410$ ), para CMV  $\chi^2 = 0,150$ , com 1 grau de liberdade, ( $p = 0,699$ ), para *H. pylori* Teste Exato de Fisher  $p = 0,429$ . Em B, porcentagem de positividade concomitante para *C. pneumoniae* e CMV entre os grupos com e sem placa aterosclerótica  $\chi^2 = 0,376$ , com 1 grau de liberdade, ( $p = 0,540$ ).

As amostras de "transplantados" também foram distribuídas de acordo com a ausência de alterações morfológicas, presença de fibrose intimal de diferentes graus e indícios de inflamação com ou sem placa aterosclerótica.

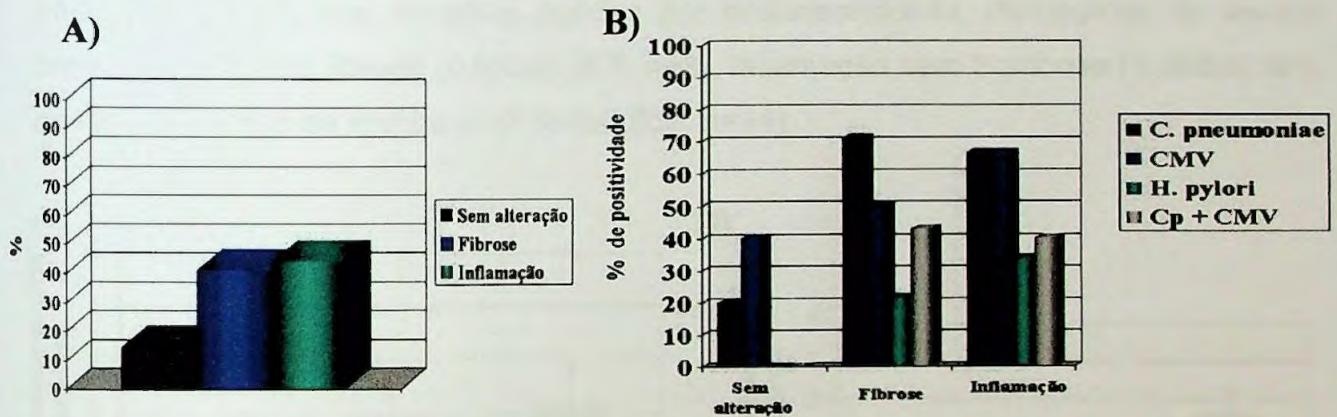
Como pode ser observado na figura 15A, 14,8% (5/34) apresentaram ausência de alterações morfológicas, 41,1% (14/34) corresponderam ao grupo com apenas

fibrose intimal de graus diferentes e 44,1% (15/34) apresentaram indícios de inflamação com ou sem placa aterosclerótica.

Já na figura 15B, pode se observar a porcentagem de positividade para os agentes infecciosos nos grupos, sendo que a positividade no grupo sem alteração morfológica foi de 20% (1/5) para *C. pneumoniae*, 40% (2/5) para CMV, 0% (0/5) para *H. pylori* e 0% (0/5) para infecção concomitante de *C. pneumoniae* e CMV.

No grupo com fibrose intimal, a positividade para *C. pneumoniae* foi de 71,4% (10/14), para CMV, 50% (7/14), para *H. pylori*, 21,3% (3/14) e para infecção concomitante de *C. pneumoniae* e CMV, foi de 42,9% (6/14) (Fig 15B).

A positividade no grupo com inflamação, com ou sem placa aterosclerótica, foi de 66,6% (10/15) para *C. pneumoniae*, 66,6% (10/15) para CMV, 33,3% (5/15) para *H. pylori* e 40,0% (6/15) para infecção concomitante de *C. pneumoniae* e CMV (Fig 15B).



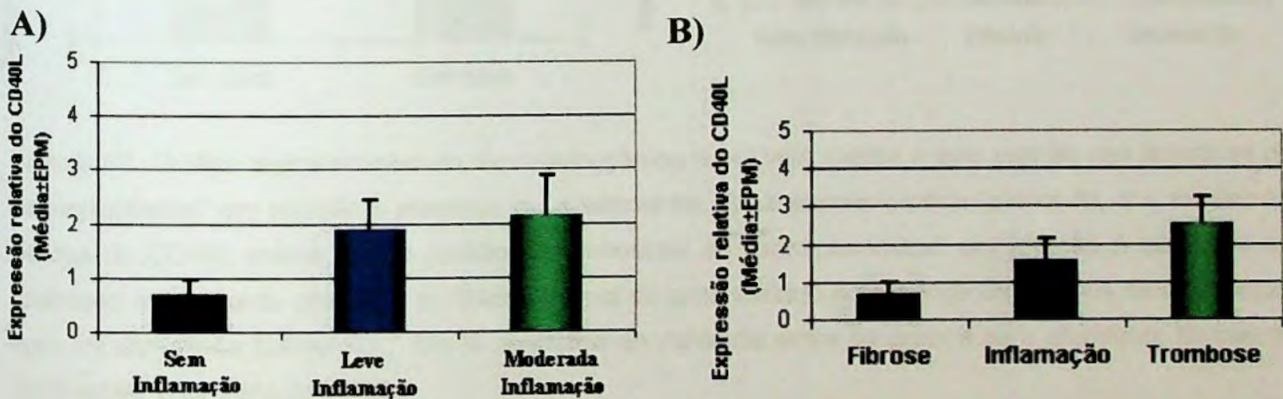
**Figura 15.** Gráfico representativo da distribuição percentual das amostras de "transplantados" sem alteração morfológica, presença de fibrose intimal de grau variado, e presença de indícios de inflamação com ou sem placa aterosclerótica (painel A), e a porcentagem de positividade para os agentes infecciosos nos grupos (painel B). \*Em B a porcentagem de positividade entre os grupos de amostras sem alteração morfológica, com fibrose ou com inflamação para *C. pneumoniae*  $\chi^2 = 4,399$ , com 2 grau de liberdade, ( $p = 0,111$ ), para CMV  $\chi^2 = 1,416$ , com 2 grau de liberdade, ( $p = 0,493$ ), para *H. pylori*  $\chi^2 = 2,374$ , com 2 grau de liberdade, ( $p = 0,305$ ), para positividade concomitante para *C. pneumoniae* e CMV  $\chi^2 = 3,223$ , com 2 grau de liberdade, ( $p = 0,200$ ).

#### 4.7. Análise histopatológica em relação à expressão gênica do CD40L

A expressão gênica relativa de CD40L foi avaliada nos grupos distribuídos de acordo com a análise histopatológica. Em 12 amostras obtidas por endarterectomia e 4 de "transplantados" não foi possível a medida da expressão gênica relativa do CD40L, sendo estas excluídas deste estudo.

Nas amostras obtidas por endarterectomia distribuídas de acordo com o grau de resposta inflamatória, as médias e erros padrão da expressão gênica relativa do CD40L nos grupos foram de  $0,693 \pm 0,281$  ( $n=8$ ) nas amostras com lesão sem inflamação,  $1,871 \pm 0,561$  ( $n=20$ ) nas amostras com lesão com inflamação leve e  $2,168 \pm 0,697$  ( $n=13$ ) na amostras com lesão com inflamação moderada (Fig 16A).

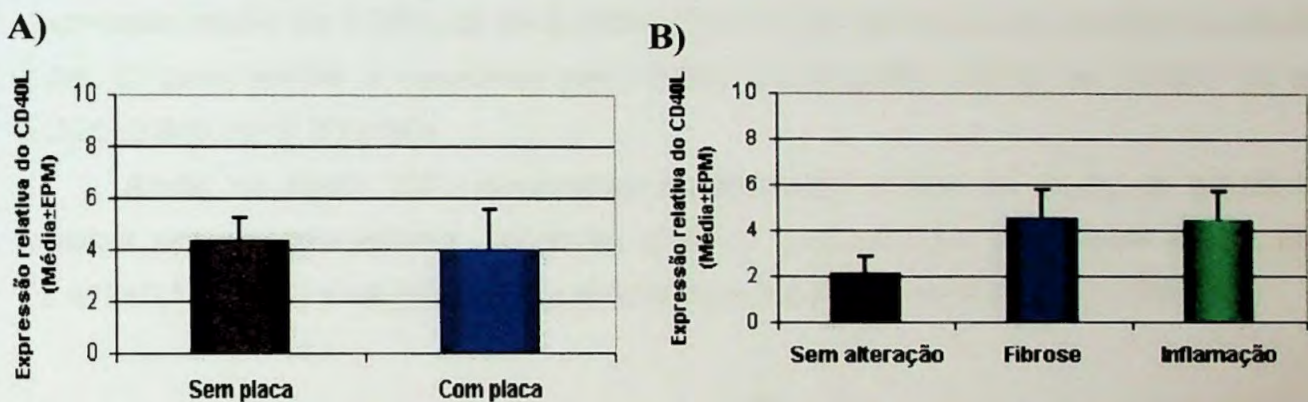
Na figura 16B podem ser observadas as médias e erros padrão da expressão gênica de CD40L nas amostras obtidas por endarterectomia, distribuídas de acordo com a presença de fibrose ( $0,693 \pm 0,281$ ,  $n=8$ ), inflamação sem trombose ( $1,568 \pm 0,561$ ,  $n=19$ ) e presença de trombose ( $2,557 \pm 0,666$ ,  $n=14$ ).



**Figura 16.** Gráfico representativo da expressão gênica do CD40L média e erro padrão nas amostras em relação ao grau de inflamação na lesão aterosclerótica, pela histologia, nas amostras obtidas por endarterectomia (painel A); e a expressão gênica do CD40L média e erro padrão nas amostras em relação à presença de somente fibrose, inflamação sem trombose e trombose (painel B). \* Em A, a análise não paramétrica de variância, Kruskal-Wallis,  $H=3,932$ , com 2 graus de liberdade,  $p=0,140$  em B,  $H=4,850$ , com 2 graus de liberdade,  $p=0,088$ .

Nas amostras de “transplantados”, distribuídas de acordo com a presença ou ausência de placa aterosclerótica, a média e erro padrão nos grupos foi de  $4,372 \pm 0,848$  ( $n=17$ ) para amostras com ausência de lesão e  $3,969 \pm 1,576$  ( $n=10$ ) no grupo com presença de placa aterosclerótica (Fig 17A).

Na figura 17B pode ser observado o valor da média e erro padrão da expressão gênica de CD40L nas amostras de “transplantados” distribuídas de acordo com a ausência de alteração morfológica ( $2,120 \pm 0,699$ ,  $n=3$ ), presença de fibrose intimal com grau variado ( $4,530 \pm 1,232$ ,  $n=11$ ) e presença de indícios de inflamação com ou sem placa ( $4,448 \pm 1,224$ ,  $n=13$ ).



**Figura 17.** Gráfico representativo da expressão gênica do CD40L média e erro padrão nas amostras de “transplantados” em relação à presença ou ausência de placa aterosclerótica (painel A), e a expressão gênica do CD40L média e erro padrão nas amostras de “transplantados” em relação à ausência de alteração morfológica, presença de fibrose intimal de grau variado e presença de indícios de inflamação com ou sem placa (painel B). \* Em B, a análise de variância entre os grupos sem alteração, fibrose, ou inflamação (ANOVA),  $p=0,646$ .

#### 4.8. Expressão gênica do CD40L em relação à positividade para os agentes infecciosos

As amostras foram distribuídas de acordo com a positividade para os agentes infecciosos e as médias e erros padrão da expressão relativa do CD40L foram calculadas para os grupos.

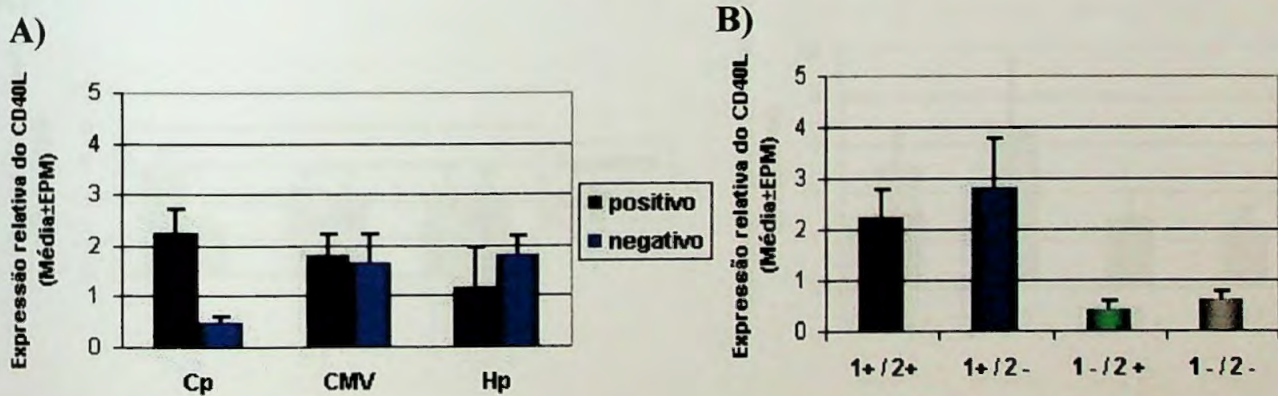
Na figura 18A observa-se que nas amostras obtidas por endarterectomia (n=44) positivas para *C. pneumoniae* a expressão média de CD40L foi de  $2,555 \pm 0,459$  (n=31), enquanto que nas amostras negativas a expressão média de CD40L foi de  $0,501 \pm 0,116$  (n=13).

Em relação à positividade para CMV, as amostras obtidas por endarterectomia positivas apresentaram expressão de CD40L média de  $1,793 \pm 0,431$  (n=29), e as negativas, de  $1,636 \pm 0,599$  (n=15).

Na figura 18A pode ser observada, ainda, a expressão média de CD40L nas amostras positivas ( $1,183 \pm 0,780$ , n=4) e negativas ( $1,795 \pm 0,373$ , n=40) para *H. pylori*.

Nas amostras positivas concomitantemente para *C. pneumoniae* e CMV a expressão média de CD40L foi de  $2,230 \pm 0,535$  (n=22). No grupo de amostras positivas para *C. pneumoniae* e negativas para CMV, a expressão média de CD40L foi de  $2,326 \pm 0,940$  (n=9) (Fig18B).

Ainda na figura 18B, observa-se a expressão média no grupo de amostras obtidas por endarterectomia negativas para *C. pneumoniae* e positivas para CMV ( $0,417 \pm 0,151$ , n=7) e negativas para ambos agentes infecciosos ( $0,600 \pm 0,186$ , n=6).



**Figura 18.** Gráfico representativo da expressão gênica do CD40L média e erro padrão nas amostras obtidas por endarterectomia em relação à positividade para os agentes infecciosos (painel A) e em relação à positividade concomitante de *C. pneumoniae* (1) e CMV (2), positividade para *C. pneumoniae* e negatividade para CMV, negatividade para *C. pneumoniae* e positividade para CMV e negatividade para ambos agentes infecciosos (painel B). \* Em A, análise não-paramétrica teste de Mann-Whitney para *C. pneumoniae* (Cp) entre os grupos positivos e negativos T=193,0 e p=0,011, em B, análise não paramétrica de variância teste de Kruskal-Wallis, H=7,095, 3 graus de liberdade, p=0,069.

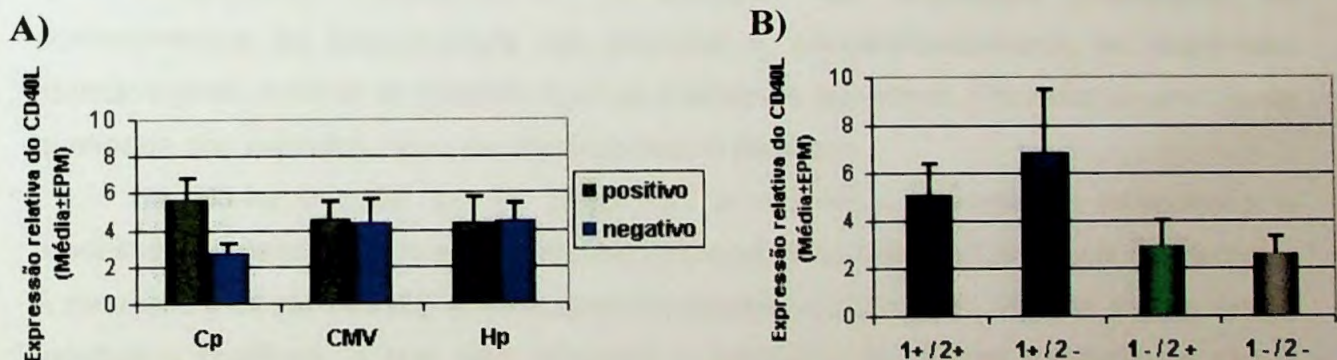
Na figura 19A observa-se nas amostras de “transplantados” positivas para *C. pneumoniae* uma expressão relativa de CD40L média de  $5,592 \pm 1,173$  (n=17), enquanto que nas amostras negativas a expressão média de CD40L foi de  $2,724 \pm 0,555$  (n=11).

Em relação à positividade para CMV, as amostras de “transplantados” positivas apresentaram expressão de CD40L média de  $4,540 \pm 1,031$  (n=16), e as negativas, de  $4,366 \pm 1,254$  (n=12) (Fig19A).

Na figura 17A pode ser observada ainda a expressão média de CD40L nas amostras de “transplantados” positivas ( $4,361 \pm 1,382$ , n=6) e negativas ( $4,493 \pm 0,937$ , n=22) para *H. pylori*.

Nas amostras de “transplantados” positivas concomitantemente para *C. pneumoniae* e CMV, a expressão média de CD40L foi de  $5,080 \pm 1,309$  (n=12). No grupo de amostras positivas para *C. pneumoniae* e negativas para CMV, a expressão média de CD40L foi de  $6,820 \pm 2,621$  (n=5) (Fig19B).

Ainda na figura 19B observa-se a expressão média no grupo de amostras de “transplantados” negativas para *C. pneumoniae* e positivas para CMV ( $2,918 \pm 1,117$ , n=4) e negativas para ambos agentes infecciosos ( $2,613 \pm 0,666$ , n=7).



**Figura 19.** Gráfico representativo da expressão gênica do CD40L média e erro padrão nas amostras de “transplantados” em relação à positividade para os agentes infecciosos (painel A); e em relação à positividade concomitante de *C. pneumoniae* (1) e CMV (2), positividade para *C. pneumoniae* e negatividade para CMV, negatividade para *C. pneumoniae* e positividade para CMV e negatividade para ambos agentes infecciosos (apainel B). \* Em A, análise não-paramétrica teste de Mann-Whitney para *C. pneumoniae* (Cp) entre os grupos positivos e negativos T=144,0 e p=0,480, em B, análise não paramétrica de variância teste de Kruskal-Wallis, H=1,235, 3 graus de liberdade, p=0,745.



## 5. DISCUSSÃO

### 5.1. Controles internos

O envolvimento das bactérias, vírus, helmintos e fungos em diversas doenças tem levado à multidisciplinaridade das pesquisas e a uma interação importante, que tem propiciado descobertas fundamentais para a melhoria de vida da população. A utilização dos métodos de pesquisa de agentes infecciosos por amplificação de segmentos de genes tem sido uma ferramenta importante na área de saúde.

A detecção de agentes infecciosos por métodos diretos a cada dia toma-se mais uma necessidade imprescindível. A evolução da tecnologia possibilitou os conhecimentos da fisiopatologia das doenças e, conseqüentemente, as exigências metodológicas tendem ao máximo rigor de padrão de qualidade. Portanto, o controle de qualidade dos métodos deve ser absolutamente realizado.

Na última década tem-se associado a presença de agentes infecciosos e processos de desenvolvimento de aterosclerose ou instabilização da placa de ateroma. A detecção indireta através de métodos imunológicos tem sido alvo de muitos falsos resultados positivos, o que não assegura a presença do agente etiológico e sim o simples contato com o mesmo. Sem dúvida, muitos métodos surgiram com bons resultados, mas ainda com muitos problemas. A metodologia de detecção de ácidos nucléicos vai ao encontro dessa necessidade, uma vez que trata-se de procedimentos que amplificam rapidamente pequenas quantidades de DNA ou RNA baseando-se em sua seqüência, com grande poder de discriminação e de sensibilidade (Boman, *et al*, 2002), além da possibilidade de automação.

Pela PCR é possível detectar DNA ou RNA de microrganismos não viáveis ou de crescimento lento, ou em materiais não apropriados para cultura. Apesar das vantagens descritas, a PCR apresenta pequenos inconvenientes que podem interferir em sua

sensibilidade se não otimizados, tais como a extração do ácido nucleico, a detecção do produto amplificado, a prevenção e identificação de falsos-positivos e falsos-negativos. Acredita-se que seja devido a esses fatores que a frequência de positividade para os agentes infecciosos tenha uma variação significativa entre os estudos. Por exemplo, o DNA da *C. pneumoniae* já foi encontrado em placas ateroscleróticas de artérias coronárias, carótidas, vasos de resistência periféricos, aneurisma aórtico abdominal, válvula cardíaca esclerótica, artérias pulmonares e em tecido atrial de coração nativo de paciente transplantado cardíaco, embora a frequência de resultados positivos tenham variado de 0 a 100% entre os estudos (Boman, *et al.*, 2002).

Como as placas de aterosclerose são compostas por diversas substâncias não celulares, como colágenos, lipídios, calcificações, distribuídas de forma heterogênea, de acordo com a gravidade da lesão e características intrínsecas de cada indivíduo, os ácidos nucleicos extraídos de tecido podem conter inibidores de reações (como para a PCR) que variam de acordo com a complexidade do tecido de origem. Daí a necessidade de um controle interno que proporcione as características de ensaio bem próximo às da amostra.

Com objetivo otimizar a PCR realizada para identificar os agentes infecciosos e colaborar na identificação de amostras com inibidores, elaborou-se controles internos para serem adicionados juntamente com o DNA da amostra. Estes foram produzidos por clonagem de fragmento previamente amplificado com os mesmos iniciadores utilizados na detecção dos agentes infecciosos.

A qualidade da extração das amostras foi avaliada pela PCR de um gene humano constitutivo em todas as células. A amplificação do gene humano não elimina a utilidade do controle interno uma vez que, geralmente, o DNA humano está em concentrações muito maiores que o DNA do agente infeccioso e a eventual presença de inibidores poderia não influenciar de maneira equivalente nas reações para o gene humano e para o agente infeccioso. Além disso, a maior quantidade de DNA humano em relação ao do agente infeccioso, poderia agir como inibidor para a reação de identificação do agente infeccioso.

Como o controle interno é co-amplificado juntamente com o DNA da amostra, existe uma competição quando a amostra é positiva, o que pode diminuir a sensibilidade da reação, dificultando a detecção de uma amostra fracamente positiva,

motivo pelo qual as amostras também foram amplificadas sem o controle interno, para assegurar a não competitividade.

Os controles internos para *C.pneumoniae* e para CMV foram construídos de acordo com o objetivo inicial e foram utilizados satisfatoriamente como controles das reações. O controle interno mostrou-se mais sensível para *C.pneumoniae* do que para CMV (Fig. 2 e 4 painel A).

Os controles internos também possibilitam sua utilização como método quantitativo, embora não tenha sido utilizado neste estudo.

O controle interno para *H. pylori* está em processo de desenvolvimento com a mesma finalidade de utilização futura.

## 5.2. Pesquisa de agentes infecciosos no sangue e tecido

A detecção dos agentes infecciosos em células sangüíneas sugere que esta seja uma das vias pelas quais atingem a parede do vaso, com ou sem placa pré-existente, através da infiltração leucocitária. Embora as porcentagens de positividade no sangue terem variado significativamente nos diferentes grupos estudados.

Berger, *et al*, 2000 foram um dos primeiros a estudar *C. pneumoniae* em leucócitos circulantes e observaram sua presença em 29% dos pacientes com estenose na artéria carótida e em 15% de pacientes com doença oclusiva arterial periférica e em 51 indivíduos saudáveis, 13% foram positivos. Não foi observada diferença estatística nos grupos de estudo e controle em relação à positividade para *C. pneumoniae* nos leucócitos, embora tenha sido observada diferença na quantidade, sendo maior o número de cópias de DNA de *C. pneumoniae* no grupo de estudo em relação ao grupo controle.

De acordo com Dunne (2000), *C. pneumoniae* pode ser encontrada em células sangüíneas em 3-46% de doadores de sangue saudáveis e de 9-59% de indivíduos com grau variado de doença aterosclerótica.

Assim como observado em nosso trabalho, Berger, *et al*. (2000), também não encontraram correlação entre a presença de *C. pneumoniae* nos leucócitos e na placa aterosclerótica, onde, em sua pesquisa, de 12 pacientes positivos na placa, 5 foram positivos nos leucócitos, e em 7 pacientes positivos nos leucócitos, nenhum foi positivo na placa.

Em relação à positividade no sangue para CMV e *H. pylori*, existem poucos relatos sobre o estudo destes agentes infecciosos em leucócitos. Neste trabalho, os agentes infecciosos puderam ser detectados em sangue periférico, porém em baixa porcentagem. Não foi observada correlação entre a positividade no sangue e no tecido para o CMV e *H. pylori*.

A falha em encontrar correlação entre a positividade para os agentes infecciosos no sangue e no tecido pode ser devido aos fatores, como episódios de re-infecções, comum para *C. pneumoniae*, que alterariam a relação de equilíbrio dinâmico do agente infeccioso na placa e nos leucócitos, favorecendo sua circulação. Situações inerentes ao hospedeiro também poderiam colaborar com o deslocamento dos agentes infecciosos para o sangue, como estados de imunossupressão transitórias.

Por outro lado, a permanência do agente infeccioso no tecido pode ser favorecida pela possibilidade dos leucócitos abrigarem o microorganismo apenas por um curto período após a infecção, não sendo possível a detecção da bacteremia durante a infecção assintomática crônica, embora isso ainda não tenha sido provado. Leucócitos infectados, particularmente monócitos e linfócitos, podem ter a expressão de moléculas de adesão aumentada, bem como a expressão de citocinas quimiotáticas, fazendo com que sejam mais rapidamente retirados da circulação e atraídos para uma região de lesão. Uma vez na lesão, esses leucócitos infectados podem contribuir para manter a resposta imunológica e inflamação, alimentando a aterosclerose (Berger, *et al.*, 2000).

Ainda deve ser observado que os pacientes que participaram deste estudo estavam sob tratamento preventivo com antibióticos de amplo espectro, o que também pode ter colaborado para a baixa frequência de positividade no sangue periférico e a falta de correlação com a positividade no tecido.

A correlação entre a presença do agente infeccioso no sangue periférico e no tecido, sendo esclarecida, poderia providenciar um recurso clínico para o acompanhamento da infecção no curso da doença.

Em relação à porcentagem de positividade para os agentes infecciosos no tecido, os resultados encontrados concordam com outros trabalhos publicados, embora tenha sido observada uma frequência de positividade bastante elevada no grupo de amostras de "transplantados". Acredita-se que seja devido ao fato desses pacientes

estarem muito debilitados devido à insuficiência cardíaca grave e sob tratamento com imunossupressor.

A maior frequência de positividade para os agentes infecciosos nas amostras de “transplantados” também pode ter ocorrido devido à presença da camada adventícia do vaso, ausente nas amostras obtidas por endarterectomia, que, de acordo com alguns pesquisadores, é o local onde se encontrou maior quantidade dos agentes infecciosos (Higuchi, *et al.*, 2000).

A alta porcentagem de positividade para CMV e *C. pneumoniae*, particularmente no grupo de transplantados, deve ser observada com cuidado, uma vez que pode haver alguma relevância clínica em relação a possibilidade de desenvolvimento futuro da aterosclerose aguda do enxerto, embora a associação desses agentes infecciosos com essa doença ainda não esteja esclarecida completamente (Cainelli, *et al.*, 2002, Subramanian, *et al.*, 2002).

### **5.3. Positividade para os agentes infecciosos em relação à análise histopatológica**

A análise histopatológica das amostras obtidas por endarterectomia demonstrou predominância de lesões com inflamação leve, em relação às lesões sem inflamação ou com inflamação moderada (Fig.9)

Foi observada diferença significativa na porcentagem de positividade para *C. pneumoniae*, mas não para CMV e *H. pylori*, nas amostras classificadas segundo o grau de resposta inflamatória pela histopatologia. Esses dados mostram que as placas com resposta inflamatória mais intensa também apresentam maior porcentagem de positividade para *C. pneumoniae*, sugerindo que a presença de *C. pneumoniae* estaria contribuindo para o aumento da resposta inflamatória no local da lesão (Fig.10). A importância da presença do agente etiológico pode ser corroborada com a presença de infecção concomitante de *C. pneumoniae* e CMV, que também apresentou relação diretamente proporcional ao grau de inflamação nas placas, embora não tenha havido diferença estatística.

Quando as amostras foram classificadas quanto à presença de trombose, inflamação e fibrose com ou sem calcificação foi observada predominância de amostras com inflamação, com cerca de 50%, porém um número significativo de

amostras apresentaram sinais de trombose, geralmente em consequência de ruptura da placa e fibrose (Fig.11).

A frequência de positividade para *C. pneumoniae* foi maior em placas instáveis, as quais se romperam evoluindo para trombose, em relação às placas estáveis caracterizadas apenas por fibrose e calcificações, concordando com um possível envolvimento dessa bactéria no processo; porém, o mesmo não foi observado para os outros agentes infecciosos (Fig.12A).

A infecção concomitante por *C. pneumoniae* e CMV foi mais freqüente em amostras que apresentaram maior indício de instabilidade, como presença de trombose e inflamação, do que em amostras com fibrose apenas, porém não diferente estatisticamente (Fig.12B).

Um resultado interessante observado foi que cerca de 50% dos “transplantados” que apresentaram placas de aterosclerose detectadas pela histopatologia (Fig.13); portanto, os efeitos causados pelos agentes infecciosos foram analisados dividindo as amostras em dois grupos, segundo a presença ou ausência de aterosclerose.

As amostras de “transplantados” com placa de aterosclerose mostraram maior porcentagem de positividade para os agentes infecciosos em relação ao grupo com ausência de lesão aterosclerótica, porém não diferente estatisticamente (Fig.14).

Não houve diferença significativa quando as amostras de “transplantados” foram distribuídas de acordo com a ausência de alteração morfológica, presença apenas de fibrose ou presença de indícios de inflamação, com ou sem placa aterosclerótica, para a pesquisa dos agentes infecciosos (Fig.15). Uma das razões que poderiam contribuir para a ausência de correlação entre a presença dos agentes infecciosos e os parâmetros morfológicos pode ser devido à presença de quantidade variada de camada adventícia nas artérias, local onde possivelmente se encontra maior quantidade de agentes infecciosos, de acordo com Higuchi, *et al.* (2000), o que estaria dificultando a normatização das amostras do grupo.

#### **5.4. Positividade para os agentes infecciosos em relação à expressão relativa de CD40L**

A expressão relativa de CD40L esteve de acordo com os resultados da análise histopatológica no grupo de amostras obtidas por endarterectomia, sendo maior quanto

maior o grau de inflamação. Estes dados apresentam o CD40L como um potencial adjuvante na análise morfológica das lesões ateroscleróticas (Fig.16).

Já as amostras de “transplantados” tiveram a expressão de CD40L aumentada em todos os grupos distribuídos de acordo com a histopatologia, mesmo no pequeno grupo de amostras sem alteração morfológica (n=3). Um dos fatos que poderia estar colaborando para este resultado é que as amostras obtidas de “transplantados” foram colhidas contendo a camada adventícia da artéria, local onde geralmente existe maior número de células inflamatórias, enquanto as amostras obtidas de pacientes submetidos a endarterectomia possuem basicamente as camadas internas média e íntima, e muito pouco ou nenhuma parte da camada adventícia.

Concordando com os dados da literatura (Macintyre, *et al.*, 2002 Dunne, *et al.*, 2000, Haranaga, *et al.*,2001) sobre sua participação no processo inflamatório na lesão aterosclerótica, as amostras obtidas por endarterectomia positivas para *C. pneumoniae* apresentaram expressão de CD40L cerca de 4 vezes maior que as negativas ( $p=0,011$ ), sugerindo que a ativação do sistema CD40/CD40L pode ser um dos mecanismos de ação pelos quais a *C. pneumoniae* favorece a evolução da placa aterosclerótica para instabilização. No grupo de “transplantados” também foi observada expressão média de CD40L maior nas amostras positivas para *C. pneumoniae* em comparação com as negativas, embora não tenha apresentado diferença estatística.

É interessante notar que não foram encontrados resultados concordantes com os de Zhou, *et al.* (1999), em relação ao efeito sinérgico devido à presença concomitante de CMV e *C. pneumoniae*. Em nosso trabalho foi observada alta frequência de positividade concomitante para ambos agentes infecciosos nas amostras, porém não foi detectado efeito sinérgico da infecção concomitante para *C. pneumoniae* e CMV em relação à expressão de CD40L. Essa ausência de sinergismo é sugerida, neste estudo, quando se observa a expressão relativa de CD40L nas amostras positivas para *C. pneumoniae* e positivas para CMV, cujo valor médio de expressão de CD40L é praticamente equivalente a expressão média de CD40L nas amostras positivas apenas para *C. pneumoniae*, embora o tamanho da amostragem seja reduzido no segundo grupo (Fig.18 e 19.B).

## 6. CONCLUSÕES

Os controles internos utilizados para pesquisa de *C. pneumoniae* e CMV garantiram a qualidade da PCR.

A identificação do DNA dos agentes infecciosos nas amostras de sangue estudadas sugere uma via de transporte até a placa de aterosclerose.

A presença de *C. pneumoniae* na lesão aterosclerótica está associada ao grau de resposta inflamatória local, nas amostras obtidas por endarterectomia analisadas pela histologia.

A *C. pneumoniae* pode ser um estímulo importante para a ativação do sistema CD40/CD40L, através do aumento da expressão de CD40L, favorecendo a evolução da placa aterosclerótica para instabilização.



---

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAM, E.; MELNICK, J.L.; PROBTSFIELD, J.L.; PETRIE, B.L.; BURCK, J.; BAILEY, K.R. *et al.* High levels of cytomegalovirus antibody in patients requiring vascular surgery for atherosclerosis. **Lancet**, London, England, v.2, p.291-293, 1987.
- ALDERSON, M.R.; ARMITAGE, R.J.; THOUGH, T.W.; STROCKBINE, L.; FANSLOW, W.C.; SPRIGGS, M.K. CD40 expression by human monocytes: Regulation by cytokines and activation of monocytes by ligand for CD40. **J Exp Med**, New York, USA, v. 178, p.669-74, 1993.
- AMERISO, S.F.; FRIDMAN, E.A.; LEIGUARDA, R.C, SEVLEVER, G.E. Detection of *Helicobacter pylori* in human carotid atherosclerotic plaques. **Stroke**, New York, USA, v.32, n.2, p.385-91, 2001.
- ANDERSON, J.L.; MUHLESTEIN, J.B.; CARLQUIST, J. Randomized secondary prevention trial of azithromycin in patients with coronary artery disease and serological evidence for *Chlamydia pneumoniae* infection: The Azithromycin in coronary artery disease: Elimination of myocardial infection with *Chlamydia* (ACADEMIC) study. **Circulation**, Dallas, Tex., USA, v.99, p.1540-7, 1999.
- AUER, J.; BERENT, R.; WEBER, T.; EBER, B. *Helicobacter pylori* infection, infectious burden, and coronary artery disease. **Am J Cardiol**, New York, USA, v.90, n.1, p.87, 2002.
- BLASI, F.; DENTI, F.; ERBA, M. Detection of *Chlamydia pneumoniae* but not *Helicobacter pylori* in atherosclerotic plaque of aortic aneurysms. **J Clin Microbiol**, Washington, USA, v.34, p.2766-9, 1996.
- BOMAN, J.; HAMMERSCHLAG, M.R. *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis: Critical assessment of diagnostic methods and relevance to treatment studies. **Clin Microbiol Rev**, Washington, DC, USA, v.15, n.1, p.1-20, 2002.

- BOUWMAN, J.J.M.; VISSEREN, F.L.J.; BOSCH, M.C.; BOUTER, K.P.; DIEPERSLOOT, R.J.A. Procoagulant and inflammatory response of virus-infected monocytes. **Eur J Clin Invest**, Oxford, England, v.32, n.10, p. 759-766, 2002.
- BRUEMMER, D.; RIGGERS, U.; HOLZMEISTER, J.; GRILL, M.; LIPPEK, F.; SETTMACHER, U.; REGITZ-ZAGROSEK, V.; FLECK, E.; GRAF, K. Expression of CD40 in vascular smooth muscle cells and macrophages is associated with early development of human atherosclerotic lesions. **Am J Cardiol**, New York, USA, v.87, p.21-27, 2001.
- BRUGGEMAN, C.A. Does Cytomegalovirus Play a Role in Atherosclerosis? **Herpes**, Worthing, West Sussex, UK, v.7, n.2, p.51-54, 2000.
- CAINELLI, F.; VENTO, S. Infections and solid organ transplant rejection: a cause-and-effect relationship? **Lancet Infect Dis**, New York, NY, USA, v.2, n.9, p. 539-49, 2002.
- CAMPBELL, L.A.; O'BRIEN, E.R.; CAPPUCIO, A.L. Detection of *Chlamydia pneumoniae* TWAR in human coronary atherectomy tissues. **J Infect Dis**, Chicago, USA, v.172, p.585-8, 1995.
- CHIU, B.; VIIRA, E.; TUCKER, W.; FONG, I.W. *Chlamydia pneumoniae*, cytomegalovirus, and herpes simplex virus in atherosclerosis of the carotid artery. **Circulation**, Dallas, Tex., USA, v.96, p.2144-2148, 1997.
- CHYU, K.Y.; SHAH, P.K. The Role of Inflammation in Plaque Disruption and Thrombosis. **Rev Cardiovasc Med**, New York, NY, USA, v.2, n.2, p.81-92, 2001.
- CHOMCZYNSKI, P.E., SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anal Biochem**, New York, USA, v.162, p.156-159, 1987.
- COOMBES, B.K.; CHIU, B.; FONG, I.W.; MAHONY, J.B. *Chlamydia pneumoniae* infection of endothelial cells induces transcriptional activation of platelet-derived growth factor-B: A potential link to intimal thickening in a rabbit model of atherosclerosis. **J Infect Dis**, Chicago, USA, v. 185, p. 1621-30, 2002.
- 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**, São Paulo, Brazil, v.74, n.2, p.124-28, 2000.

- DANESH, J.; COLLINS, R.; PETO, R. Chronic infections and coronary artery disease: is there a link? *Lancet*, London, England, v. 350, p.430-6, 1997.
- DEGRÉ, M. Has cytomegalovirus infection any role in the development of atherosclerosis? *Clin Microbiol Infect*, Paris, France, v. 8, p.191-195, 2002.
- DUGAN, J.P.; FEUGE, R.R.; BURGESS, D.S. Review of evidence for a connection between *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerotic disease. *Clin Ther*, Princeton, NJ, USA, v.24, n.5, p.719-35, 2002
- DUNNE, M. The evolving relationship between *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis. *Curr Opin Infect Dis*, Hagerstown, MD, USA, v.13, p.583-91, 2000.
- DURIE, F.H.; FAVA, R.A.; FOY, T.M.; ARUFFO, A.; LEDBETTER, J.A.; NOELLE, R.J. Prevention of collagen-induced arthritis with antibody to gp39, the ligand for CD40. *Science*, Washington, USA, v.261, 1328-30, 1993.
- ESPINOLA-KLEIN, C.; RUPPRECHT, H.J.; BLANKENBERG, S.; BICKEL, C.; COP, H.; RIPPIN, G.; VICTOR, A.; HAFNER, G.; SCHLUMBERGER, W.; MEYER, J. Impact of Infectious Burden on Extent and Long-Term Prognosis of Atherosclerosis. *Circulation*, Dallas, Tex., USA, v.105, p.15-21, 2002.
- FARSAK, B.; YILDIRIR, A.; AKYÖN, Y.; PINAR, A.; ÖÇ, M.; BÖKE, E.; KES, S.; TOKGÖZOĞLU, L. Detection of *Chlamydia pneumoniae* and *Helicobacter pylori* DNA in Human Atherosclerotic Plaques by PCR. *J Clin Microbiol*, Washington, USA, v.38, n.12, p. 4408-4411, 2000.
- FERRARI, S.; GILIANI, S.; INSALACO, A.; AL-GHONAIUM, A.; SORESINA, A.R.; LOUBSER, M.; AVANZINI, M.A.; MARCONI, M.; BADOLATO, R.; UGAZIO, A.G.; LEVY, Y.; CATALAN, N.; DURANDY, A.; TBAKHI, A.; NOTARANGELO, L.D.; PLEBANI, A. Mutations of CD40 gene cause na autosomal recessive form of immunodeficiency with hyper IgM. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Wasington, USA, v.98, n.22, p.12614-9, 2001.
- FOLSOM, A.R.; NIETO J.F.; SORLIE, P.; CHAMBLESS, L.E.; GRAHAM, D.Y. *Helicobacter pylori* seropositivity and coronary heart disease incidence, *Circulation*, Dallas, Tex, USA, v.98, p.845-50, 1998.
- FONG, I.W. Infections and their role in atherosclerotic vascular disease. *J Am Dent Assoc*, Chicago, USA, v.133, p.7S-13S, 2002.

- FONG, I.W.; CHIU, B.; VIIRA, E.; JANG, D.; FONG, M.W.; PEELING, R.; MAHONY, J.B. Can antibiotic (macrolide) prevent *Chlamydia pneumoniae*-induced atherosclerosis in a rabbit model? **Clin Diagn Lab Immunol**, Washington, DC, USA, v.6, p.891-894, 1999.
- FONG, I.W.; CHIU, B.; VIIRA, E.; JANG, D.; MAHONY, J.B. Influence of clarithromycin on early atherosclerotic lesions after *Chlamydia pneumoniae* infection in a rabbit model. **Antimicrobial Agents Chemother**, Bethesda, MD, USA, v.46, n.8, p.2321-2326, 2002.
- FROBERG, M.K.; ADAMS, A.; SEACOTTE, N.; PARKER-THORNBURG, J.; KOLATTUKUDY, P. Cytomegalovirus Infection Accelerates Inflammation in Vascular Tissue Overexpressing Monocyte Chemoattractant Protein-1. **Circ Res**, Baltimore, MD, USA, v. 89, p.1224-1230, 2001.
- GARLICH, C.D.; JOHN, S.; SCHMEIBER, A.; ESKAFI, S.; STUMPF, C.; KARL, M.; GOPPELT-STRUEBE, M.; SCHMIEDER, R.; DANIEL, M.D. Upregulation of CD40 and CD40 ligand (CD154) in patients with moderate hypercholesterolemia. **Circulation**, Dallas, Tex., USA, v.104, n.20, p.2395-2400, 2001.
- GATTONE, M.; IANCOVIELLO, L.; COLOMBO, M.; CASTELNUOVO, A.D.; SOFFIANTINO, F.; GRAMONI, A.; PICCO, D.; BENEDETTA, M.; GIANNUZZI, P. *Chlamydia pneumoniae* and cytomegalovirus seropositivity, inflammatory markers, and the risk of myocardial infarction at a young age. **Am Heart J**, St. Louis, USA, v.142, p.633-40, 2001.
- GAYDOS, C.A.; QUIN, T.C.J.; EIDEN, J. Identification of *Chlamydia pneumoniae* by DNA amplification of the 16S rRNA gene. **J Clin Microbiol**, Washington, USA, v.30, p.796-800, 1992.
- GERRITSE, K.; LAMAN, J.D.; NOELLE, R.J. CD40-CD40 ligand interactions in experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, Washington, USA, v.93, 2499-504, 1996.
- GRATTAN, M.T.; MORENO-CABRAL, C.E.; STARNES, V.A. *Et al.* Cytomegalovirus infection is associated with cardiac allograft rejection and atherosclerosis. **JAMA**, Chicago, USA, v.261, p.3561-3566, 1989.

- GRAYSTON, J.T. *Chlamydia pneumoniae* (TWAR). In Mandell, G.L., Dolin, R. **Principles and practice of infectious disease**. 4<sup>th</sup> ed., v.2, New York: Churchill Livingstone, p.1696-1701, 1995.
- GRIFFITHS, P.D. Tomorrow's Challenges for Herpesvirus Management: Potential Applications of Valacyclovir. **J Infect Dis**, Chicago, USA, v.186, n.1, p.S131-7, 2002.
- GUETTA, E.; SCARPATI, E.M.; DICORLETO, P.E. Effect of cytomegalovirus immediate early gene products on endothelial cell gene activity. **Cardiovasc Res**, Amsterdam, Netherlands, v.50, p.538-546, 2001.
- GURFINKEL, E.; BOZOVICH, G. *Chlamydia pneumoniae*: inflammation and instability of the atherosclerotic plaque. **Atherosclerosis**, Amsterdam, Elsevier, Netherlands, v.140, n.suppl.1, p.S31-S35, 1998.
- GURFINKEL, E.B.G.; BECK, E.; TESTA, E.; LIVELLARA, B.; MAUTNER, B. The ROXIS study group. Treatment with the antibiotic roxithromycin in patients with acute non-Q-wave coronary syndromes. **Eur Heart J**, London, Saunders, England, v.20, p.121-7, 1999.
- GUTSTEIN, D.E.; FUSTER, V. Pathophysiology and clinical significance of atherosclerotic plaque rupture. **Cardiovasc Res**, Amsterdam, Netherlands, v.41, p.323-333, 1999.
- HAMAMDZIC, D.; HARLEY, R.A.; HAZEN-MARTIN, D.; LEROY, E.C. MCMV induces neointima in IFN- $\gamma$ R-/- mice: Intimal cell apoptosis and persistent proliferation of myofibroblasts. **BMC Musculoskelet Disord**, London, England, v.2, p.3, 2001.
- HAMMAR, M.; TYSZKIEWICZ, T.; WADSTROM, T.; O'TOOLE, P.W. Rapid detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy material by polymerase chain reaction. **J Clin Microbiol**, Washington, USA, v.30, p.54-8, 1992.
- HARANAGA, S.; YAMAGUCHI, H.; FRIEDMAN, H.; IZUMI, S.; YAMAMOTO, Y. *Chlamydia pneumoniae* infects and multiplies in lymphocytes in vitro. **Infect Immun**, Bethesda, MD, USA, v.69, n.12, p.7753-9, 2001.
- HENDRIX, M.G.; DAEMAN, M.; BRUGGEMAN, C.A. Cytomegalovirus nucleic acid distribution within the human vascular tree. **Am J Pathol**, Philadelphia, USA, v.138, p.563-567, 1991.
- HERNANDEZ, G.L.; VOLPERT, O.V.; INIGUEZ, M.A.; LORENZO, E.; MARTINEZ-MARTINEZ, S.; GRAU, R.; FRESNO, M.; REDONDO, J.M. Selective inhibition of

- vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis by cyclosporin A: roles of the nuclear factor of activated T cells and cyclooxygenase 2. **J Exp Med**, New York, USA, v.193, p.607-620, 2001.
- HIGUCHI, M.L.; CASTELLI, J.B.; AIELLO, V.D.; PALOMINO, S.; REIS, M.M.; SAMBIASE, N.V.; FUKASAWA, S.; BEZERRA, H.; RAMIRES, J.A. Great amount of *C. pneumoniae* in ruptured plaques vessel segments at autopsy. A comparative study with stable plaques. **Arq Bras Cardiol**, São Paulo, Brazil, v.72, n.2, p.149-151, 2000.
- HIGUCHI, M.L.; SAMBIASE, N.; PALOMINO, S.; GUTIERREZ, P.; DEMARCHI, L.M.; AIELLO, V.D.; RAMIRES, J.A.F. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* in ruptured atherosclerotic plaques. **Rev Bras Pesqui Med Biol**, São Paulo, Brasil, v.33, p.1023-6, 2000.
- HIRASHIMA, Y.; KUWAYAMA, N.; KUBO, M.; ORIGASA, H.; ENDO, S. *Chlamydia pneumoniae* infection is not involved in carotid artery stenosis. **Atherosclerosis**, Amsterdam, Elsevier, Netherlands, v.163, p.165-8, 2002.
- HSICH, E.; ZHOU, Y.F.; PAIGEN, B.; JOHNSON, T.M.; BURNETT, M.S.; EPSTEIN, S.E. Cytomegalovirus infection increases development of atherosclerosis in Apolipoprotein-E knockout mice. **Atherosclerosis**, Amsterdam, Elsevier, Netherlands, v.156, p.23-28, 2001.
- JAHAN, N.; RAZZAQUE, A.; BRADY, J.; ROSENTHAL, L.J. The Human cytomegalovirus mtrII collinear region in strain Tanaka is transformation defective. **J Virol**, Baltimore, USA, v.63, n.6, p.2866-2869, 1989.
- KIENER, P.A.; MORA-DAVIS, P.; RANKIN, B.M.; WAHL, A.F.; ARUFFO, A.; HOLLENBAUGH, D. Stimulation of CD40 with purified soluble gp39 induce proinflammatory responses in human monocytes. **J Immunol**, Baltimore, USA, v.155, p.4917-25, 1995.
- KINLAY, S.; SELWYN, A. Effects of statins on inflammation in patients with acute and chronic coronary syndromes. **Am J Cardiol**, New York, USA, v. 91, n.4A, p.9B-13B, 2003.
- KOHARA, K.; TABARA, Y.; YAMAMOTO, Y.; IGASE, M.; MIKI, T. *Chlamydia pneumoniae* seropositivity is associated with increased plasma levels of soluble cellular adhesion molecules in community-dwelling subjects. The Shimanami Health

- promoting Program (J-SHIP) Study. **Stroke**, New York, USA, v.33, p.1474-9, 2002.
- KOLIA, M.; FONG, I.W. *Chlamydia pneumoniae* and cardiovascular disease. **Curr Infect Dis Rep**, Philadelphia, PA, USA, v.4, p.35-43, 2002.
- KOWALSKI, M.; REES, W.; KONTUREK, P.C.; GROVE, R.; SCHEFFOLD, T.; MEIXNER, H.; BRUNEC, M.; FRANZ, N.; KONTUREK, J.M.; PIENIAZEK, P.; HAHN, E.G.; KONTUREK, S.J.; THALE, J.; WARNECKE, H. Detection of *Helicobacter pylori* specific DNA in human atheromatous coronary arteries and its association to prior myocardial infarction and unstable angina. **Dig Liver Dis**, Roma, Italy, v.34, n.6, p.398-402, 2002.
- KUO, C.C.; GOWN, A.M.; BENDITT, E.P.; GRAYSTON, J.T. Detection of *Chlamydia pneumoniae* in aortic lesions of atherosclerosis by immunocytochemical stain. **Arterioscler Thromb**, Dallas, TX, USA, v.13, p.1501-4, 1993.
- KUSTERS, J.G.; KUIPERS, E.J. Helicobacter and atherosclerosis. **Am Heart J**, St. Louis, USA, v.138, n.5, p.S523-S527, 1999.
- KUTLIN, A.; ROBLIN, P.M.; HAMMERCHLAG, M.R. Effect of prolonged treatment with azithromycin, clarithromycin or levofloxacin on *Chlamydia pneumoniae* in a continuous-infection model. **Antimicrobial Agents Chemother**, Bethesda, MD, USA, v. 46, n.2, p.409-12, 2002.
- LEINONEN, M.; SAIKKU, P. Evidence for infectious agents in cardiovascular disease and atherosclerosis. **Lancet Infect Dis**, New York, NY, USA, v.2, p.11-17, 2002.
- LEMSTRÖM, K.B.; BRUNING, J.H.; BRUGGEMAN, C.A. *et al.* Cytomegalovirus infection-enhanced allograft arteriosclerosis is prevented by DHPG prophylaxis in the rat. **Circulation**, Dallas, Tex, USA, v. 90, p.1969-1978, 1994.
- LEMSTRÖM, K.B.; BRUNING, J.H.; BRUGGEMAN, C.A.; LAUTHENSCHLAGER, I.T. Cytomegalovirus infection enhances smooth muscle cell proliferation and intimal thickening of rat aortic allografts. **J Clin Invest**, New Haven, USA, v.92, n.2, p.549-558, 1993.
- LEVI, M. CMV endothelitis as a factor in the pathogenesis of atherosclerosis. **Cardiovasc Res**, Amsterdam, Netherlands, v.50, p.432-433, 2001.
- LIBBY, P. Inflammation in atherosclerosis. **Nature**, London, England, v.420, p.868-874, 2002.

- LIBBY, P.; O'BRIEN, K. Culture of quiescent arterial smooth muscle cells in a defined serum-free medium. **J Cell Physiol**, Philadelphia, USA, v.115, p.217-23, 1983.
- LIN, W.R.; WOZNIAK, M.A.; WILCOCK, G.K.; ITZHAKI, R.F. Cytomegalovirus Is Present in a Very High Proportion of Brains from Vascular Dementia Patients. **Neurobiol Dis**, San Diego, CA, USA, v.9, p.82-87, 2002.
- LINDHOLT, J.S.; ASHTON, H.A.; SCOTT, R.A. Indicators of infection with *Chlamydia pneumoniae* are associated with expansion of abdominal aortic aneurysms. **J Vasc Surg**, St. Louis, MO, USA, v.34, n.2, p. 212-5, 2001.
- LOEHE, F.; BITTMANN, I.; WEILBACH, C.; LAUTERJUNG, L.; SCHILBERG, F.; HEISS, M.M. *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerosis lesions of patients undergoing vascular surgery. **Ann Vasc Surg**, Detroit, USA, v.16, n.4, p.467-73, 2002.
- LU, J.J.; PERNG, C.L.; SHYU, R.Y.; CHEN, C.H.; LOU, Q.; CHONG, S.K.F.; LEE, C.H. Comparison of Five PCR Methods for Detection of *Helicobacter pylori* DNA in Gastric Tissues. **J Clin Microbiol**, Washington, USA, v.37, n.3, p.772-774, 1999.
- LUTGENS, E.; DAEMEN, M.J. CD40-CD40L interactions in atherosclerosis. **Trends Cardiovasc Med**, New York, USA, v.12, p.27-32, 2002.
- MAASS, M.; BARTELS, C.; KRÜGER, S.; KRAUSE, E.; ENGEL, P.M.; DALHOFF, K. Endovascular presence of *Chlamydia pneumoniae* DNA is a generalized phenomenon in atherosclerotic vascular disease. **Atherosclerosis**, v.140(S1), p.S25-S30, 1998.
- MAASS, M.; KRAUSE, E.; ENGEL, P.M. Endovascular presence of *Chlamydia pneumoniae* in patients with hemodynamically effective carotid artery stenosis. **Angiology**, v.48, p.699-706, 1997.
- MACH, F.; SCHÖNBECK, U.; BONNEFOY, J.Y.; POBER, J.S.; LIBBY, P. Activation of monocyte/macrophage functions related to acute atheroma complication by ligation of CD40. Induction of collagenase, stromelysin and tissue factor. **Circulation**, v.96, p.396-9, 1997.
- MACH, F.; SCHÖNBECK, U.; LIBBY, P. CD40 signaling in vascular cells: A key role in atherosclerosis? **Atherosclerosis**, Amsterdam, Elsevier, Netherlands, v.137, p.S89-S95, 1998.
- MACH, F.; SCHÖNBECK, U.; SUKHOVA, G.K. Funcional CD40 ligand is expressed on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages:



- Implications for CD40-CD40 ligand signaling in atherosclerosis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, Washington, USA, v.94, p.1931-6, 1997.
- MACH, F.; SUKHOVA, G.K.; MICHETTI, M.; LIBBY, P.; MICHETTI, P. Influence of *Helicobacter pylori* Infection During Atherogenesis In Vivo in Mice. **Circ Res**, Baltimore, MD, USA, v.90, p.e1-e4, 2002.
- MACINTYRE, A.; HAMMOND, C.J.; LITTLE, C.S.; APPELT, D.M.; BALIN, B.J. *Chlamydia pneumoniae* infection alters the junctional complex protein of human brain microvascular endothelial cells. **FEMS Microbiol Lett**, Amsterdam, Netherlands, v.217, p.167-172, 2002.
- MALNICK, S.D.H.; GOLAND, S.; KAFTOURY, A.; SCHWARZ, H.; PASIK, S.; MASHIACH, A.; STHOEGER, Z. Evaluation of carotid arterial plaque after endarterectomy for *Helicobacter pylori* infection. **Am J Cardiol**, New York, USA, v.83, n.11, p.1586-7, 1999.
- MAYR, M.; KIECHL, S.; MENDALL, M.A.; WILLEIT, J.; WICK, G.; XU, Q. Increased risk of atherosclerosis is confined to CagA-positive *Helicobacter pylori* strains: prospective results from the Bruneck study. **Stroke**, New York, USA, v.34, n.3, p.610-5, 2003.
- McDONALD, K.; RECTOR, T.S.; BRAULIN, E.A. *Et al.* Association of coronary artery disease in cardiac transplant recipients with cytomegalovirus infection. **Am J Cardiol**, New York, USA, v.64, p.359-362, 1989.
- MELISSANO, G.; BLASI, F.; ESPOSITO, G.; TARSIA, P.; DORDONI, L.; AROSIO, C.; TSHOMBA, Y.; FAGETTI, L.; ALLEGRA, L.; CHIESA, R. *Chlamydia pneumoniae* eradication from carotid plaque. Results of an open, randomised treatment study. **Eur J Vasc Endovasc Surg**, London, UK, v.18, 155-9, 1999.
- MELNICK, J.L.; HU, C.; BUREK, J.; ADAM, E.; DEBAKEY, M.E. Cytomegalovirus DNA in Arterial Walls of Patients With Atherosclerosis. **J Med Virol**, New York, USA, v.42, v.170-174, 1994.
- MENDALL, M.A.; GOGGIN, P.M.; MOLINEAUX, N. Relation of *Helicobacter pylori* infection and coronary heart disease. **Br Heart J**, London, England, v.71, p.437-9, 1994.

- MOAZED, T.C.; CAMPBELL, L.A.; ROSENFELD, M.E.; GRAYSTON, J.T.; KUO, C.C. *Chlamydia pneumoniae* infection accelerates the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. **J Infect Dis**, Chicago, USA, v.180, p.238-41, 1999.
- MOHAN, C.; SHI, Y.; LAMAN, J.D.; DATTA, S.K. Interaction between CD40 and its ligand gp39 in the development of murine lupus nephritis. **J Immunol**, Baltimore, USA, v.154, p.1470-80, 1995.
- NETO, L.B.S.; RIBEIRO, J.P. Infectious Agents in Coronary Atherosclerosis. **Arq Bras Cardiol**, São Paulo, Brazil, v.73, p.459-462, 1999.
- NGEH, J.; ANAND, V.; GUPTA, S. *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis – what we know and what we don't. **Clin Microbiol Infect**, Paris, France, v.8, p. 2-13, 2002
- NICHOLSON, A.C.; HAJJAR, D.P. Viral activation of the coagulation cascade. **Am Heart J**, St, Louis, USA, v.138, p.S461-4, 1999.
- NOELLE, R.J.; ROY, M.; SHEPHERD, D.M.; STAMENKOVIC, I.; LEDBETTER, J.A.; ARUFFO, A. A 39 kDa protein on activated helper T lymphocytes binds CD40 and transducers the signal for cognate activation of B-cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, Washington, USA, v.89, p.6550-4, 1992.
- ONG, G.; THOMAS, B.J.; MANSFIELD, A.O.; DAVIDSON, B.R.; TAYLOR-ROBINSON, D. Detection and widespread distribution of *Chlamydia pneumoniae* in the vascular system and its possible implications. **J Clin Pathol**, London, England, v.49, p.102-6, 1996.
- OSSEI-GERNING, N.; MOAYYEDI, P.; SMITH, S.; BRAUNHOLTZ, D.; WILSON, J.I.; AXON, A.T.R.; GRANT, P.J. *Helicobacter pylori* infection is related to atherosclerosis in patients undergoing coronary angiography. **Cardiovasc Res**, Amsterdam, Netherlands, v.35, p.120-124, 1997.
- PALFREY, D.; COOK, P.J.; SMYTHE, J.A.; LIP, G.Y.H.; HINE, A.V. Simplified preparation of human arterial sections for PCR analysis of *Chlamydia pneumoniae* and human DNA. **Mol Pathol**, London, England, v.52, p.289-294, 1999.
- PASCERI, V.; CAMMAROTA, G.; PATTI, G.; CUOCO, L.; GASBARRINI, A.; GRILLO, R.L.; FEDELI, G.; GASBARRINI, G.; MASERI, A. Association of virulent *Helicobacter pylori* strains with ischemic heart disease. **Circulation**, Dallas, Tex., USA, v.97, n.17, p.1675-9, 1998.

- PENG, D.; ZHAO, S.; LI, Y.; LI, J.; ZHOU, H. Elevated soluble CD40L is related to the endothelial adhesion molecules in patients with acute coronary syndrome. **Clin Chim Acta**, Amsterdam, Elsevier, Netherlands, v.319, p.19-26, 2002.
- POORT, S.R.; ROSENDAAL, F.R.; REITSMA, P.H.; BERTINA, R.M. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. **Blood**, New York, USA, v.88, n.10, p.3698-703, 1996.
- PRASAD, A.; ZHU, J.; HALCOX, J.P.J.; WACLAWIW, M.A.; EPSTEIN, S.E.; QUYYMI, A.A. Predisposition to atherosclerosis by infections: Role of endothelial dysfunction. **Circulation**, Dallas, Tex., USA, v.106, p.184-90, 2002.
- RADKE, P.W.; MERKELBACH-BRUSE, S.; MESSMER, B.J.; DAHL, J.V.; DÖRGE, H.; NAAMI, A.; VOGEL, G.; HANDT, S.; HANRATH, P. Infectious agents in coronary lesions obtained by endarterectomy: pattern of distribution, coinfection, and clinical findings. **Coron Artery Dis**, London, England, v.12, p.1-6, 2001.
- REINHARDT, B.; MINISINI, R.; MERTENS, T. Opinion Article: Cytomegalovirus is a Risk Factor in Atherogenesis. **Herpes**, Worthing, West Sussex, UK, v.9, n.1, p.21-3, 2002.
- ROSNER, B. **Fundamentals of biostatistics**. 2.ed. Boston: PWS, p.579, 1986.
- ROSS, R. The pathogenesis of atherosclerosis: A perspective for the 1990s. **Nature**, London, England, v.362, p.801-9, 1993.
- ROTHSTEIN, N.M.; QUINN, T.C.; MADICO, G.; GAYDOS, C.A.; LOWENSTEIN, C.J. Effect of azithromycin on murine arteriosclerosis exacerbated by *Chlamydia pneumoniae*. **J Infect Dis**, Chicago, USA, v.183, n.2, p.232-238, 2001.
- SAIKKU, P. Diagnosis of *Chlamydia pneumoniae*. **Clin Microbiol Infect**, Paris, France, v.4, p.4S7-13, 1998.
- SAIKKU, P.; LEINONEN, M.; MATTILA, K.; EKMAN, M.R.; NIEMINEM, M.S.; MAKELA, P.H.; HUTTUNEM, J.K.; VALTONEN, V. Serological evidence of an association of a novel Chlamydia, TWAR, with chronic coronary heart disease and acute myocardial infarction. **Lancet**, London, England, v.2, n.8618, p.983-6, 1988.
- SAKO, T.; TAKAHASHI, T.; TAKEHANA, K.; UCHIDA, E.; NAKADE, T.; UMEMURA, T.; TANIYAMA, H. Chlamydial infection in canine atherosclerosis lesions. **Atherosclerosis**, Amsterdam, Elsevier, Netherlands, v. 162, p. 253-59, 2002.

- SALAZAR, L.A.; HIRATA, M.H.; CAVALLI, S.A.; MACHADO, M.O.; HIRATA, R.D. Optimized procedure for DNA isolation from fresh and cryopreserved clotted human blood useful in clinical molecular testing. **Clin Chim Acta**, Amsterdam, Elsevier, Netherlands, v.44(8-1), p.1748-50, 1998.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.R.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2.ed. Col Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, p.E10-E14, 1989.
- SCHATTNER, E.J.; MASCARENHAS, J.; REYFMAN, I.; KOSHY, M.; WOO, C.; FRIEDMAN, S.M.; CROW, M.K. Chronic lymphocytic leukemia B cells can express CD40L and demonstrate T-cell type costimulatory capacity. **Blood**, New York, USA, v.91, n.8, p.2689-97, 1998.
- SCHÖNBECK, U.; LIBBY, P. CD40 signaling and plaque instability. **Circ Res**, Baltimore, MD, v.89, p.1092-1103, 2001.
- SCHÖNBECK, U.; MACH, F.; SUKHOVA, G.K. Regulation of matrix metalloproteinase expression in human vascular smooth muscle cells by T-lymphocytes: A role for CD40 signaling in plaque rupture? **Circ Res**, Baltimore, MD, v.81, p.448-54, 1997.
- SCHÖNBECK, U.; MACH, F.; SUKHOVA, HERMAN, M.; GRABER, P.; KEHRY, M.R.; LIBBY, P. CD40 ligation induces tissue factor expression in human vascular smooth muscle cells. **Am J Pathol**, Philadelphia, USA, v.156, n.1, p.7-14, 2000.
- SCHÖNBECK, U.; SUKHOVA, G.K.; SHIMIZU, K.; MACH, F.; LIBBY, P. Inhibition of CD40 signaling limits evolution of established atherosclerosis in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, Washington, USA, v.97, n. 20, p.7458-7463, 2000.
- SCHOOEN, F.J. and COLTRAN, R.S. Blood vessels. In: COLTRAN, R.S., KUMAR, V., COLLINS, T. **Robbins Pathologic basis of disease**, 6<sup>th</sup> ed., Philadelphia:W.B. Saunders, p.493-542, 1999.
- SCHUMACHER, A.; SELJEFLØT, I.; LERKERØD, A.B.; SOMMERVOLL, L.; OTTERSTAD, J.E.; ARNESEN, H. Does infection with *Chlamydia pneumoniae* and/or *Helicobacter pylori* increase the expression of endothelial cell adhesion molecules in humans? **Clin Microbiol Infect**, Paris, France, v.8, p.654-661, 2002.
- SEMB, A.G.; VAN WISSEN, S.; UELAND, T.; SMILDE, T.; WAEHRE, T.; TRIPP, M.D.; FROLAND, S.S.; KASTELEIN, J.J.; GULLESTAD, L.; PEDERSEN, T.R.; AUKRUST, P.; STALENHOF, A.F. Raised serum levels of soluble DC40 ligand in with familial

- hypercholesterolemia: downregulatory effect of statin therapy. **J Am Coll Cardiol**, New York, USA, v.41, n.2, p.275-9, 2003.
- SHAH, P.K. Mechanisms of Plaque Vulnerability and Rupture. **J Am Coll Cardiol**, New York, USA, v.41, n.4suppl.8, p.15S-22S, 2003.
- SHI, Y.; TOKUNAGA, O. Herpesvirus (HSV-1, EBV and CMV) infection in atherosclerotic compared with non-atherosclerotic aortic tissue. **Pathol Int**, Carlton South, Vic., Australia, v.52, p.31-39, 2002.
- SHOR, A.; KUO, C.C.; PATTON, D.L. Detection of *Chlamydia pneumoniae* in coronary arterial fatty streaks and atheromatous plaques. **S Afr Med J**, Cape Town, South Africa, v.82, n.3, p.158-61, 1992.
- SHULZHENKO, N.; MORGUN, A.; FRANCO, M.; SOUZA, M.M.; ALMEIDA, D.R.; DINIZ, R.V.Z.; CARVALHO, A.C.C.; PACHECO-SILVA, A.; GERBASE-DELIMA, M. Expression of CD40 ligand, interferon-gamma and Fas ligand genes in endomyocardial biopsies of human cardiac allografts: correlation with acute rejection. **Braz J Med Biol Res**, São Paulo, Brazil, v34, p.779-784, 2001.
- SPEIR, E.; HUANG, E.S.; MODALI, R.; LEON, M.B.; SHAWL, F.; FINKEL, T.; EPSTEIN, S.E. Interaction of human cytomegalovirus with p53: possible role in coronary restenosis. **Scand J Infect Dis Suppl**, Stockholm, Sweden, v.99, p.78-81, 1995.
- SUBRAMANIAN, A.K.; QUINN, T.C.; KICKLER, T.S.; KASPER, E.K.; TUCKER, P.C. Correlation of *Chlamydia pneumoniae* infection and severity of accelerated graft arteriosclerosis after cardiac transplantation. **Transplantation**, Baltimore, USA, v.73, n.5, p.761-4, 2002.
- SUGIMOTO, K.; SHIRAKI, K.; ITO, T.; FUJIKAWA, K.; TAKASE, K.; TAMEDA, Y.; MORIYAMA, M.; NAKANO, T. Expression of functional CD40 in human hepatocellular carcinoma. **Hepatology**, Baltimore, MD, USA, v.30, n.4, p.920-6, 1999.
- TAYLOR-ROBINSON, D. *Chlamydia pneumoniae* in vascular tissue. **Atherosclerosis**, Amsterdam, Elsevier, Netherlands, v140, p.S21-S24, 1998.
- TAYLOR-ROBINSON, D.; THOMAS, B.J. *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerotic tissue. **J Infect Dis**, Chicago, USA, v181, n.suppl.3, p.S437-40, 2000.
- TOKUNAGA, K.; NAKAMURA, Y.; SAKATA, J.; FUJIMORI, K.; OHKUBO, M.; SAWADA, K.; SAKIYAMA, S. Enhanced expression of a glyceraldehyde-3 phosphate

- dehydrogenase gene in human lung cancer. **Cancer Res**, Chicago, USA, v.47, 5616-19, 1987.
- TONDELLA, M.L.C.; TALKINGTON, D.F.; HOLLOWAY, B.P.; DOWELL, S.F.; COWLEY, K.; SORIANO-GABARRO, M.; ELKIND, M.; FIELDS, B. Development and evaluation of real-time PCR-based fluorescence assays for detection of *Chlamydia pneumoniae*. **J Clin Microbiol**, Washington, USA, v.40, n.2, p.575-83, 2002.
- VITA, J.A. Shouldering the risk factor burden; infection, atherosclerosis, and the vascular endothelium. **Circulation**, Dallas, Tex., USA, v.106, n.2, p.164-6, 2002.
- VLIEGEN, I.; STASSEN, F.; GRAULS, G.; BLOK, R.; BRUGGEMAN, C. MCMV infection increases early T-lymphocyte influx in atherosclerotic lesions in apoE knockout mice. **J Clin Virol**, Amsterdam, Netherlands, v.25, p.S159-S171, 2002.
- WAISKI, M.; LAZOWSKI, T.; SZOSTEK, M.; OPOISKI, G.; CELARY-WAISKA, R.; ANDRUSZKIEWICZ, P.; RYBA, M. Electron microscope investigation of the role of *Chlamydia* sp. In the process of rebuilding the arterial wall. Neoangiogenesis in atherosclerotic plaques in human cervical artery walls. **Med Sci Monit**, Warsaw, Poland, v.8, n.1, p.BR30-8, 2002.
- WIMMER, M.L.; SANDMANN-STRUPP, R.; SAIKKU, P.; HABERL, R.L. Association of chlamydial infection with cerebrovascular disease. **Stroke**, New York, USA, v.27, n.12, p.2207-10, 1996.
- WITHERELL, H.L.; SMITH, K.L.; FRIEDMAN, G.D.; LEY, C.; THOM, D.H.; ORENTREICH, N.; VOGELMAN, J.H.; PARSONNET, J. C-reactive Protein, *Helicobacter pylori*, *Chlamydia pneumoniae*, Cytomegalovirus and Risk for Myocardial Infarction. **Ann Epidemiol**, New York, NY, USA, v.13, p.170-177, 2003.
- WONG, Y.K.; THOMAS, M.; TSANG, V.; GALLAGHER, P.J.; WARD, M.E. The prevalence of *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerotic and nonatherosclerotic blood vessels of patients attending for redo and first time coronary artery bypass graft surgery. **J Am Coll Cardiol**, New York, USA, v.33, p.152-6, 1999.
- YAMAGUCHI, H.; HARANAGA, S.; WIDEN, R.; FRIEDMAN, H.; YAMAMOTO, Y. *Chlamydia pneumoniae* infection induces differentiation of monocytes into macrophages. **Infect Immun**, Bethesda, MD, USA, 70, n.5, p.2392-8, 2002.

- YELLIN, M.J.; BRETT, J.; BAUM, D. Functional interaction of t-cells with endothelial cells: The role of CD40L-CD40-mediated signals, **J Exp Med**, New York, USA, v. 182, p.1857-64, 1995.
- YELLIN, M.J.; WINIKOFF, S.; FORTUNE, S.M. Ligation of CD40 on fibroblasts induces CD54 (ICAM-1) and CD106 (VCAM-1) upregulation, IL6 production and proliferation. **J Leukoc Biol**, New York, USA, v.58, p.209-16, 1995.
- ZHOU, Y.F.; SHOU, M.; GUETTA, E.; GUZMAN, R.; UNGER, E.F.; YU, Z.X.; ZHANG, J.; FINKEL, T.; EPSTEIN, S.E. Cytomegalovirus infection of rats increases the neointimal response to vascular injury without consistent evidence of direct infection of the vascular wall. **Circulation**, Dallas, Tex., USA, v.5, p.1569-75, 1999.
- ZHOU, Y.F.; SHOU, M.; HARRELL, R.F.; YU, Z.X.; UNGER, E.F.; EPSTEIN, S.E. Chronic non-vascular cytomegalovirus infection: effects on the neointimal response to experimental vascular injury. **Cardiovasc Res**, Amsterdam, Netherlands, v.45, p.1019-1025, 2000.