

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE BACTÉRIAS EM PLACAS ATEROMATOSAS POR SEQUENCIAMENTO GÊNICO

**Rafael Stanisce M. dos Santos¹, Adolfo J. da Mota², Alecsandro de Moura Silva³
Leonardo Marchini⁴ e Francisco G. da Nóbrega⁵**

1, 2, 3, 5 - Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento – IP&D, Universidade do Vale do Paraíba
Av. Shishima Hifumi, 2911 – Urbanova – 12244-000 – São José dos Campos-SP.

e-mail: rafaelstms@msn.com; adolfo.mot@gmail.com.br; fgdnobre@univap.br

4 – Universidade do Vale do Paraíba, Universidade de Taubaté, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. leomarchini@directnet.com.br

Resumo- A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica que evolui com formação de placas no interior das artérias. Uma dieta rica em gordura saturada e colesterol pode levar ao aparecimento de alterações ultra-estruturais resultantes do acúmulo de pequenas partículas lipoprotéicas na íntima. Há divergências quanto à lesão inicial que desencadearia o processo de formação da placa. Uma discussão importante que vem sendo levantada é se um determinado agente infeccioso poderia estar envolvido na gênese das placas que obstruem as artérias. Embora microrganismos como a *Chlamydia pneumoniae* e o *Citomegalovírus* tenham sido isolados dessas placas, ainda não há provas da relação de causa e efeito. Este projeto teve como objetivo geral investigar a presença de bactérias em placas ateromatosas de dez pacientes, em diversos sítios, através da ribotipagem por sequenciamento. Foi possível identificar quatro gêneros de bactérias orais existentes em amostras de dois dos dez pacientes estudados.

Palavras-chave: Aterosclerose, Bactérias, PCR, Sequenciamento gênico.

Área do Conhecimento: Ciências Biológicas

Introdução

Os eventos iniciais da aterogênese humana permanecem amplamente conjecturais, porém, o cruzamento das informações obtidas a partir de lesões aterogênicas de pacientes humanos jovens com os resultados dos estudos experimentais da aterogênese em modelos animais fornece sugestões a esse respeito. Ao se iniciar uma dieta aterogênica rica em colesterol e gordura saturada, uma das primeiras alterações ultra-estruturais é o acúmulo de pequenas partículas de lipoproteínas na íntima. As partículas de lipoproteínas ligadas ao proteoglicano parecem promover um aumento da suscetibilidade às modificações químicas ou oxidativas, o que contribuiria fortemente para o início da biogênese da placa ateromatosa. (WILLIAMS; TABAS, 1998).

A busca de um “gatilho” que dispararia a lesão inicial na aterosclerose gerou a hipótese de infecção por certas bactérias, entre elas *Chlamydia pneumoniae* e certos vírus, em especial o citomegalovírus, na etiologia da aterosclerose. Contudo, há uma grande polêmica a respeito, devido à sobreposição de fatores predisponentes. Por exemplo, fumantes tem uma incidência mais alta de bronquite por *C. pneumoniae*, portanto, evidências de infecção por esta bactéria podem servir simplesmente como marcadoras do tabagismo, um fator de risco conhecido para eventos ateroscleróticos. É difícil separar a coincidência da casualidade quando a maioria da população estudada tem evidências de

infecção e aterosclerose. (KRUTH, 1997); (O'BRIEN, et al., 1994).

Outro ponto questionável é que as próprias células no interior do ateroma podem ser um local para a infecção. Por exemplo, os macrófagos, que se encontram na lesão aterosclerótica estabelecida, poderiam tornar-se infectados por *C. pneumoniae*, o que possibilitaria a estimulação e a ativação destas células, acelerando as vias inflamatórias que, atualmente, se admite agirem no interior da íntima aterosclerótica. Os produtos microbianos específicos, os lipopolissacarídeos, proteínas do choque térmico poderiam agir localmente, ao nível da parede arterial, para potencializar a aterosclerose nas lesões infectadas. (KALAYOGLU, et al., 1999); (KOL et al., 2000).

Consequentemente, conhecer melhor a diversidade microbiana existente nas placas e/ou tecidos adjacentes pode contribuir de maneira relevante para entender melhor a história natural da lesão. Os microrganismos existentes nos inúmeros nichos naturais existentes (colonizando animais, plantas, águas, solos, etc) são de cultivo e isolamento muito particular, com a grande maioria ainda não cultivável. Métodos moleculares independentes de cultivo ampliaram brutalmente nosso conhecimento da diversidade microbiana, sendo um marco na microbiologia moderna. O conhecimento que resultar desta análise, baseada no gene 16S ribossomal, eventualmente poderá dar origem a medidas profiláticas e/ou terapêuticas futuras para esta importante doença.

Material e Métodos

O presente trabalho foi submetido ao comitê de ética da UNIVAP, tendo sido aprovado conforme o protocolo nº: H363/CEP/2007.

Os pacientes que concordaram em participar deste estudo, foram orientados e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

O grupo estudado conta de dez pacientes, todos portadores de doença vascular com presença de placas ateromatosas em sítios anatômicos variados. As amostras foram acondicionadas após sua remoção cirúrgica em tubos estéreis e colocadas em caixas térmicas com gelo para transporte e então acondicionadas até sua manipulação em -80°C

As amostras foram descongeladas e manipuladas em fluxo laminar. Fragmentos de aproximadamente 1mm foram congelados em nitrogênio líquido e masserados completamente.

O masserado foi ressuspenso em solução tampão A (0,3M sacarose (MERK); 50 mM Tris-HCL (USB) pH 8,5; 5 mM EDTA (MERK) adicionando-se a seguir a solução de lisozima (2mg/50mL). Incubou-se à 37°C por 30 minutos. Em seguida adicionou-se solução de proteinase K (Sigma) (1mg/50 µL) e SDS a 10% (Sigma). A mistura foi homogeneizada e incubada à 55°C em Banho Maria (Marconi) por duas horas, agitando-se os tubos a cada 30 minutos. Findado o período de incubação, os tubos foram centrifugados e o sobrenadante, transferindo para um eppendorf. Adiciona-se Tris-HCl, 1M pH 8,5 e fenol clorofórmio álcool isoamílico (FCI) na proporção 25:24:1 respectivamente. Seguiu-se uma agitação mecânica forte e centrifugação. O sobrenadante foi coletado com cautela para não haver contaminação com o FCI, sendo transferindo para um eppendorf novo. Adicionou-se éter etílico, nova agitação mecânica, seguida de uma centrifugação. O éter foi aspirado em um sistema a vácuo. Adicionou-se RNase (USB) 10 µg.mL⁻¹ e incubou-se a 37 °C por 1h. Repetiu-se a extração com FCI e éter. Em seguida foi realizada a precipitação, utilizamos glicogênio, NaCl, Etanol Absoluto e Etanol 80%.

Em seguida foi realizada a reação de PCR (kit Go Taq da Promega) para amplificar o gene ribossomal 16S bacteriano. Para uma reação de 25 µL, foi utilizado 1X do tampão para PCR, 3 mM MgCl₂, 0,2mM de dNTPs, 0,4 µM dos "primers" 155 e 156 (Tabela 1), 50 ng de DNA, 0,2µL de Taq DNA polimerase (5U/µL) e água milli Q q.s.p. A amplificação foi realizada no termociclador Express Thermal Cycler da Hybaid Limited, segundo o programa que consta de uma desnaturação inicial à 95°C por 3 minutos, seguida de 30 ciclos de: 30 segundos a 95°C (desnaturação da cadeia recém sintetizada), 30 segundos à 58°C (anelamento dos

oligonucleotídeos) e 50 segundos à 72°C (elongação da cadeia). Ao término dos 30 ciclos, para que a Taq DNA polimerase adicione uma base adenina a extremidades das cadeias criando pontas coesivas nos produtos da amplificação, procedeu-se um único ciclo a 72°C por 10 minutos.

| N | Seqüência | Referência |
|------|--------------------------------|-----------------------------|
| 155 | 5' TGA CAA CTG TAG AAA TAC AGC | TRAN T <i>et al</i> , 1997 |
| 156 | 5' CGC CTC TCT CCT ATA AAT | TRAN, T <i>et al</i> , 1997 |
| 78SS | 5' GTA AAA CGA CGG CCA GT | TOPO TA cloning kit |
| 79SR | 5' CAG GAA ACA GCT ATG AC | TOPO TA cloning kit |

Tabela 1: "Primers" utilizados nesse trabalho. N = número.

Após a reação da PCR foi realizada a eletroforese em gel de agarose para verificar se houve amplificação. O produto de PCR foi quantificado em espectrofotômetro (U 2001 HITACHI).

A clonagem dos produtos de PCR foi realizada com o Kit TOPO TA Cloning da Invitrogen, vetor pCR 2.1-TOPO, conforme as orientações do Kit.

A preparação do DNA plasmidial dos transformantes foi realizada segundo o protocolo de (SAMBROOK, RUSSELL, 2001).

Para uma reação de sequenciamento de 10 µL, utilizamos 2.0 µL mix de seqüenciamento *et terminator* (Amersham), 0,4 µM oligonucleotídeos 155, 156, 78SS e 79SR (tabela 1) (um para cada reação), aproximadamente 800 ng de pDNA (DNA plasmidial) e água Milli Q. A amplificação foi realizada segundo o programa que consta de 40 ciclos de: 30 segundos à 95 °C (desnaturação), 30 segundos à 50 °C (hibridização dos oligonucleotídeos) e 2 minutos a 60 °C (elongação da cadeia).

A reação de seqüenciamento foi precipitada com 6µL de NG 1mg/mL (glicogênio dissolvido em 5M NH₄Oac), etanol 95%. As amostras foram ressuspenso em formamida e em seguida submetidas à desnaturação antes de serem aplicadas no seqüenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystems). As seqüências do rDNA no formato FASTA, foram processadas com o programa BLAST ("Basic Local Alignment Search Tool"), usando a ferramenta BLASTN ("nucleotide sequence against nucleotide database sequences") disponível no NCBI com a finalidade de buscar identificação por similaridade frente às seqüências registradas para o gene ribossomal 16S.

Resultados

A partir do DNA extraído, obtivemos amplificação positiva, com os iniciadores genéricos de bactéria, de todas as amostras estudadas (Figura 1).

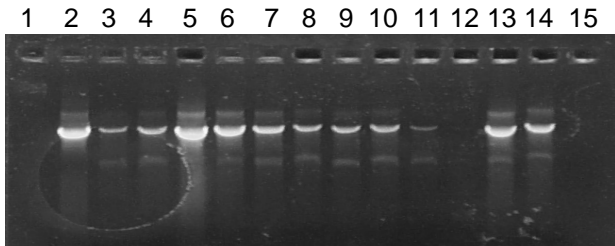


Figura 1: eletroforese em gel de agarose 1% da reação do PCR dos 10 pacientes: 1 e 15 controle negativo (AD e STOP MIX A); 2 padrão (aproximadamente 1800 bp); 3 controle positivo; 4 pac 1; 5 pac 2; 6 pac 3; 7 pac 4; 8 pac 5; 9 pac 6; 10 pac 7; 11 e 12 pac 8; 13 pac 9 e 14 pac 10.

A figura 2 ilustra a preparação do pDNA usado na reação de seqüenciamento. Nela, as bandas com inserto estão acima dos controles (poços 1 e 7), um vetor recircularizado sem inserto.

Em nossos resultados foi possível verificar a presença de bactérias orais no material de apenas dois dos dez pacientes estudados (tabela 2). Para os demais pacientes, todos os clones seqüenciados resultaram na identificação de bactérias de solo, sendo *Paenibacillus sp* e *Bacillus sp* o que sugere uma possível contaminação no momento da coleta do material.

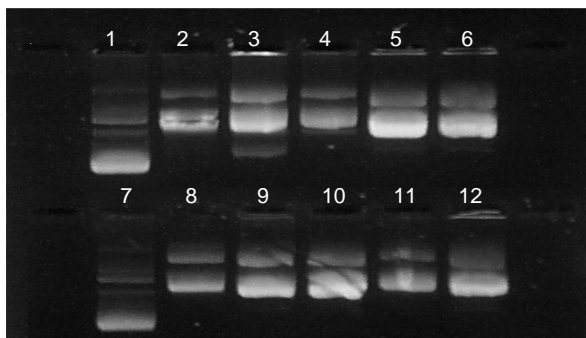


Figura 2: eletroforese em gel de agarose 1% da mini-prep DNA. dos 10 pac: 1 e 7 controle, 2 pac 1, 3 pac 2, 4, pac 3, 5 pac 4, 7 pac 5, 8 pac 6, 9 pac 7, 10 pac 8, 11 pac 9 e 12 pac 10.

| P. | C. | E. V. | M. I. | MICROORGANISMO |
|----|----|-------|-------|-----------------------------------|
| 1 | 1 | 0.0 | 99% | <i>Veillonella. sp oral</i> |
| 1 | 3 | 0.0 | 98% | <i>Veillonella sp</i> |
| 1 | 5 | 0.0 | 98% | <i>Veillonella. sp oral</i> |
| 1 | 6 | 0.0 | 98% | <i>Veillonella. sp</i> |
| 9 | 1 | 0.0 | 98% | <i>Porphyromonas gingivalis</i> |
| 9 | 2 | 0.0 | 98% | <i>Porphyromonas gingivalis</i> |
| 9 | 3 | 0.0 | 99% | <i>Streptococcus sp. Oral</i> |
| 9 | 4 | 0.0 | 100% | <i>Staphylococcus lugdunensis</i> |
| 9 | 5 | 0.0 | 99% | <i>Veillonella sp. oral</i> |
| 9 | 6 | 0.0 | 98% | <i>Veillonella sp. oral</i> |
| 9 | 7 | 0.0 | 97% | <i>Staphylococcus sp</i> |
| 9 | 8 | 0.0 | 99% | <i>Streptococcus salivarius</i> |
| 9 | 12 | 0.0 | 97% | <i>Streptococcus salivarius</i> |

Tabela 2: P = Paciente, C = clone, E. V = E Value, M. I. = Max Identificação.

Discussão

Durante os últimos anos numerosos trabalhos, utilizando a técnica do PCR, mostram uma possível associação da *Chlamydia pneumoniae* e

outros patógenos com o desenvolvimento da aterosclerose (COCHRANE, et al., 2003).

Apfalter, et al. (2004) avaliaram 75 pacientes portadores de aterosclerose. Antes do ato cirúrgico foram coletadas amostras de sangue periférico para testes imunológicos e, após procedimento cirúrgico, o material retirado foi estudado com a técnica de PCR em tempo real, específico para *C. pneumoniae*. Os autores observaram que 89% dos pacientes tiveram anticorpos específicos para *C. pneumoniae*, mas os patógenos não foram detectados pela técnica de PCR em tempo real.

Hagiwara et al. (2007) investigaram um total de 50 placas de aterosclerose utilizando a técnica da PCR com iniciadores específicos para *C. pneumoniae*, Citomegalovírus (CMV), Vírus da Herpes Simples (HSV), e *H. pylori* e por imunocitoquímica (ICC) para *C. pneumoniae*. Detectaram DNA de HSV em 2 espécimes (4%) e ICC positiva para *C. pneumoniae* em 8 (16%). Porém não obtiveram resultados positivos para *C. pneumoniae* usando a técnica da PCR. Do mesmo modo, nós não observamos *Chlamydia* no presente trabalho.

Kozarov et al. (2006) investigaram em 29 pacientes com aterosclerose a presença de bactérias orais e *Chlamydia pneumoniae*, através do seqüenciamento utilizando o rDNA 16S para diferentes espécies, sendo elas: *Porphyromonas gingivais*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythensis*, *Eikenella corrodens*, *Prevotella intermedia*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus mutans*, *Treponema denticola* e *C. pneumoniae*. Em seus resultados, quase metade das amostras de DNA foram positivas para *A. actinomycetemcomitans* e *C. pneumoniae*. *S. aureus* e *S. epidermidis* foi encontrado com menor freqüência, 5 e 10%, respectivamente. *S. mutans* foi encontrada em cerca de 20% das amostras.

No presente trabalho, o gênero *Veillonella* foi encontrado em 20% dos pacientes, em resultado compatível com aquele encontrado no sangue após escovação e extração dentária (Bahrani-Mougeot et al., 2008). Do mesmo modo, *S. salivarius* e *P. gingivalis* foram encontrados neste trabalho em quantidades relativas na placa aterosclerótica similares àquelas verificadas por Nakano et al. (2006).

Segundo BÉLANGER et al. (2006) *P. gingivalis* é um importante agente patogênico implicado com a periodontite, também freqüentemente associado à aterosclerose. Esta última associação pode ocorrer mediante a invasão direta do endotélio vascular, ou pela indução de resposta imune exacerbada, ocasionada pela infecção oral crônica (Gibson III et al., 2006).

Adicionalmente, a identificação de *Staphylococcus lugdunensis*, uma bactéria

comensal da pele já correlacionada com infecções importantes como septicemia, endocardite e osteomielite (Seifert et al., 2005), foi verificada em placa ateromatosa pela primeira vez no presente estudo, no qual a abordagem molecular mediante sequenciamento do 16S rDNA de amplicons obtidos a partir de primers genéricos para Eubacteria foi utilizada de modo pioneiro em placas ateromatosas.

Conclusão

Os resultados obtidos não são conclusivos principalmente pelo grande número de bactérias de solo identificadas, sugerindo uma possível contaminação da amostra. Contudo, a metodologia de amplificação usando iniciadores genéricos para bactérias, seguida de clonagem e sequenciamento do 16S rDNA parece ser uma metodologia viável e ainda pouco explorada que poderia contribuir de forma relevante para melhor definir o perfil bacteriano das placas ateromatosas.

Agradecimentos

Ao Dr. José Eduardo Domingues e ao Dr. Carlos Maldonado Campoy, responsáveis pelas valiosas amostras obtidas para realização deste trabalho.

Referências

- APFALTER, P.; BAROUSCH, W.; NEHR, M.; WILLINGER, B.; ROTTER, M.; HIRSCHL, A. No evidence of involvement of *Chlamydia pneumoniae* in severe cerebrovascular atherosclerosis by means of quantitative real-time polymerase chain reaction. **Stroke**, V.35. n.9 p. 2024-2028, 2004.
- BAHRANI-MOUGEOT, F., K.; PASTER, B., J.; COLEMAN, S.; ASHAR, J.; BARBUTO, S.; LOCKHART, P., B.; Diverse and novel oral bacterial species in blood following dental procedures. **J Clin Microbiol.** 2008 Jun;46(6):2129-32. E. pub 2008 Apr 23.
- BÉLANGER, M.; RODRIGUES, P. H.; DUNN W. A. Jr.; PROGULSKE-FOX, A.; Autophagy: a highway for *Porphyromonas gingivalis* in endothelial cells, **Autophagy**, 2 (3): 165-70 2006.
- COCHRANE, M. et al. Distribution of *Chlamydia pneumoniae* DNA in Atherosclerotic Carotid arteries: Significance for Sampling Procedures. **Journal of clinical microbiology**. V.41, n.4, p. 1454-1457. 2003.
- GIBSON III, F., C.; YUMOTO, H.; TAKAHASHI, Y.; CHOW, H.-H.; GENCO, C. A.; Innate Immune Signaling and *Porphyromonas*

gingivalis accelerated Atherosclerosis. **J Dent Res** 85(2):106-121, 2006.

- HAGIWARA, N.; TOYODA, K.; INOUE, T.; SHIMADA, H.; IBAYASHI, S.; IIDA, M.; OKADA, Y. Lack of association between infectious burden and carotid atherosclerosis in Japanese patients. **J Stroke Cerebrovasc. Dis.** V. 16 n. 4 p. 145-52.
- KALAYOGLU, M.V.; HOERNEMAN, B.; LA VERDA, D.; et al: Cellular oxidation of low-density lipoprotein by *Chlamydia pneumoniae*. **J Infect Dis.** 180:780-790, 1999.
- KOL, A.; LICHTMAN, A.H.; FINBERG, R.W.; et al: Heat shock protein (HSP) 60 activates the innate immune response: CD14 is an essential receptor for HSP60 activation of mononuclear cells. **J Immunol.** 164:13-17, 2000.
- KORAZOV, E.; SWEIER, D.; SHELBURNE, C.; PROGULSKE-FOX, A.; LOPATIN, D., Detection of bacterial DNA in atheromatous plaques by quantitative PCR, **Microbes Infect.**, 8 (3): 687-93 2006.
- KRUTH, H.S.: The fate of lipoprotein cholesterol entering the arterial wall. **Curr. Opin. Lipidol** 8:246-252, 1997.
- NAKANO, K.; INABA, H.; NOMURA, R.; NEMOTO, H.; TAKEDA, M.; YSHIOKA, H.; MATSUE, H.; TAKAHASHI, T.; TANIGUCHI. K.; AMANO, A.; OOSHIMA, T.; Detection of cariogenic *Streptococcus mutans* in extirpated heart valve and atheromatous plaque specimens. **J Clin Microbiol.** 2006 Sep;44(9):3313-7.
- O'BRIEN, E.R.; GARVIN, M.R.; DEV, R.; et al: Angiogenesis in human coronary atherosclerotic plaques. **Am. J. Pathol** 145:883-894, 1994.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd ed., New York : **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 2001.
- SEIFERT, H.; OLTMANN, D.; BECKER, K.; WISPLINGHOFF H.; VON EIFF C.; *Staphylococcus lugdunensis* pacemaker-related infection. **Emerg Infect Dis.** 2005;11(8):1283-6.
- TRAN, T.; FLYNN, M. J.; CHEN, C.; SLOTS, J.; Absence of *Porphyromonas asaccharolytica*, *Bacterioides fragilis* and *Chlamydia pneumoniae* in human subgingival plaque. **Oral Microbiol. Immunol.**, 12 (6): 377-8, 1997.
- WILLIAMS, K.J., TABAS, I.: The response-to-retention hypothesis of atherogenesis reinforced. **Curr. Opin. Lipidol** 9:471-474, 1998.