

**RAQUEL DE QUEIROZ FAGUNDES**

Estudo da co-participação de infecção natural pela  
***Chlamydophila pneumoniae*** e ***Mycoplasma pneumoniae***  
na aterogênese experimental em coelhos

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo para obtenção do  
título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Cardiologia

Orientadora: Profa. Dra. Maria de Lourdes Higuchi

São Paulo

2006

*“Agora, pois, permanecem a fé, a esperança e o amor, estes três;  
Desses, o maior é o amor”.*

*I Coríntios, 13.*

*Dedicatória*



*Dedico este trabalho aos meus pais Neuza de Jesus Queiroz Fagundes e Ailton Fagundes a quem devo toda a minha formação, como profissional, como cidadã e como ser humano. A vocês que, mesmo distantes são meus exemplos de dedicação, alegria de viver, caráter e amor, o meu muito obrigada.*

*Dedico-o ainda ao meu amado esposo Fabrício Carrijo Rodrigues, companheiro querido de todas as horas. Quem me faz ter absoluta certeza de que a vida vale a pena. Pelo imenso carinho, paciência e amor incondicionais.*

*“Amor que não se pede, Amor que não se mede, que não se repete. Amor...”.*

*Não poderia deixar de dedicar o presente trabalho também aos coelhos, sem os quais ele não seria possível. O meu profundo carinho e respeito.*

*Agradecimientos*



*À Profa. Dra. Maria de Lourdes Higuchi, minha orientadora, pelo constante incentivo. A esse exemplo de profissionalismo, dedicação, perseverança em relação ao trabalho e progresso da ciência, a minha grande admiração.*

*A todos os funcionários do Laboratório de Anatomia Patológica do InCor-HCFMUSP, que sempre me auxiliaram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.*

*Aos funcionários e amigos do laboratório de Imunohistoquímica do InCor-HCFMUSP onde foram realizadas as técnicas aplicadas na pesquisa em especial Dra. Nádia, Dra. Márcia, Sueli e Antônio; sempre dispostos a ajudar. Obrigada pelo carinho.*

*Ao Gerson, pela paciência e boa vontade ao me ensinar a trabalhar com o quantificador de imagens “Quantimet Leica” e eventuais ajudas com a informática. Obrigada pela amizade.*

*A Dra. Junko T. Osaka do Departamento de Técnica Cirúrgica da FMUSP. Por sempre disponibilizar-se para a realização dos procedimentos com os animais e material necessário.*

*Às “meninas”, secretárias da pós-graduação Neuza, Eva e Juliana sempre tão presentes nesse período, pela eficiência e pela convivência sempre agradável. Obrigada pela paciência nas fases de “correria”.*

*Às minhas amigas, que conheci durante a pós-graduação, Alessandra Rogério, Renata Ikegami, Maria Alice P. de Castro e Maria Cristina D. Abduch, pelo incentivo e alegria de sempre.*

*À Sueli B. Damy, pela enorme ajuda no início do trabalho com os animais e pelo exemplo de amor à pesquisa.*

*Ao meu irmão Ailton de Queiroz Fagundes, com quem aprendo sempre sobre a importância de “Não andar pelo caminho traçado, pois ele conduz somente até onde os outros foram”.*

*Ao meu primo e amigo Délio José Braz Jr., sempre a me incentivar a ser melhor como profissional e como pessoa, de quem recebo grandes lições.*

*Ao querido amigo Luciano F. Borges companheiro de pós-graduação, pelo carinho e respeito.*

*À família tão especial que ganhei; Sueli, José Carlos, Ana Paula e Leandro. Agradeço pela torcida!*

*Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico CNPq, pelo suporte financeiro a este trabalho.*



Esta dissertação ou tese está de acordo com:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias da FMUSP*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2004.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

*Sumário*



Lista de abreviaturas	
Lista de gráficos	
Lista de tabelas	
Lista de quadros	
Lista de figuras	
Resumo	
<i>Summary</i>	
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>22</b>
<b>3 MÉTODOS</b> .....	<b>25</b>
3.1 Material .....	26
3.1.1 Animais .....	26
3.2 Metodologia .....	27
3.2.1 Confeção da dieta .....	28
3.2.2 Coleta de sangue e métodos laboratoriais .....	28
3.2.3 Sacrifício dos animais .....	29
3.2.4 Estudo anatomopatológico .....	30
3.2.4.1 Preparo da aorta .....	30
3.2.4.2 Microscopia óptica .....	31
3.2.4.3 Variáveis do estudo .....	32
3.2.4.4 Análise das variáveis .....	32
3.2.4.5 Imunohistoquímica .....	34
3.2.4.6 Análise dos agentes infecciosos .....	36
3.2.5 Metodologia estatística .....	37
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>38</b>
4.1 Variáveis estudadas .....	39
4.1.1 Visão geral dos resultados das variáveis .....	39
4.2 Comparação entre os segmentos torácico e abdominal .....	42
4.2.1 Análise da espessura das camadas íntima, média e adventícia .....	42
4.2.2 Análise do perímetro, inflamação e quantidade de gordura na placa .....	43
4.2.3 Análise dos agentes infecciosos .....	44
4.3 Comparação do espessamento intimal nos grupos A, B e C nos segmentos estudados .....	45
4.3.1 Análise da comparação dos agentes infecciosos entre si nos diferentes grupos nos segmentos estudados .....	47
4.3.2 Análise do espessamento intimal e sua relação com a presença dos agentes infecciosos nos segmentos estudados .....	48
4.3.3 Correlação entre perímetro e espessamento intimal .....	50

4.3.4	Análise da inflamação nos dois segmentos .....	52
4.3.4.1	Análise semiquantitativa do infiltrado inflamatório e sua relação com a presença dos agentes infecciosos nos dois segmentos .....	53
4.3.5	Análise da fibrose .....	55
4.3.6	Análise do colesterol total e frações .....	56
4.4	Comparação da quantificação macroscópica da gordura pelo método de coloração Sudan IV na superfície intimal da aorta dos grupos A, B e C .....	59
4.4.1	Comparação da quantificação macroscópica da gordura pelo método de coloração Sudan IV entre os segmentos torácico e abdominal .....	60
4.5	Análise da razão entre quantidade de antígenos do <i>Mycoplasma pneumoniae</i> versus de <i>Chlamydothila</i> <i>pneumoniae</i> (MP/CP) nos grupos A, B e C .....	62
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>64</b>
5.1	Considerações iniciais .....	65
5.2	Nossos achados .....	67
5.2.1	Quantidade de agentes infecciosos versus intensidade de espessamento intimal .....	67
5.2.2	Diferenças entre os segmentos torácico e abdominal da aorta quanto à infecção e remodelamento vascular .	73
5.2.3	Inflamação, fibrose e macroscopia .....	75
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>78</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>80</b>

*Listas*



## LISTA DE ABREVIATURAS

AAA	aneurisma de aorta abdominal
ATP	adenosina trifosfato
<i>C. pneumoniae</i>	<i>Chlamidophila pneumoniae</i>
CP	<i>Chlamidophila pneumoniae</i>
CMV	citomegalovírus
dp	desvio padrão
DNA	ácido desoxirribonucléico
HDL	High density protein (proteína de alta densidade)
IAP	International Atherosclerosis Project
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
LDL	Low density protein (proteína de baixa densidade)
LEE	Lâmina elástica externa
LPS	lipopolissacarídeos
RNA	ácido ribonucléico
<i>M.pneumoniae</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
MP	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
mm	milímetros
mm <sup>2</sup>	milímetros quadrados
μm	micrômetros
μm <sup>2</sup>	micrômetros quadrados

PCR	Polymerase Chain Reaction
PBS	phosphate buffered saline
RPM	rotações por minutos
TNF	Fator de necrose tumoral
vs	versus

## LISTA DE GRÁFICOS

	página
Gráfico 1	Distribuição de valores de média e mediana da espessura da placa de aterosclerose nas porções torácica e abdominal segundo os diferentes grupos estudados ..... 45
Gráfico 2	Distribuição de valores de mediana em mm <sup>2</sup> da espessura da placa de aterosclerose nas porções torácica e abdominal e distribuição da fração de área de MP e CP segundo os diferentes grupos estudados . 49
Gráfico 3	Distribuição de valores de mediana em mm <sup>2</sup> da espessura da placa de aterosclerose nas porções torácica e abdominal e distribuição de mediana em mm do perímetro da aorta nos segmentos torácico e abdominal ..... 51
Gráfico 4	Distribuição de valores de mediana da frequência do grau inflamatório nas camadas íntima e adventícia das porções torácica e abdominal segundo os diferentes grupos estudados ..... 53
Gráfico 5	Distribuição de valores de mediana em mm <sup>2</sup> da espessura da placa de aterosclerose nas porções torácica e abdominal e distribuição de mediana em mm do perímetro da aorta nos segmentos torácico e abdominal ..... 55
Gráfico 6	Distribuição de valores de mediana do espessamento intimal, porcentagem de área de fibrose na placa de aterosclerose e porcentagem de área positiva para MP e CP (MP e CP x 10 <sup>-1</sup> ) nas porções torácica e abdominal, segundo os diferentes grupos estudados ... 56
Gráfico 7	Distribuição de valores de mediana das dosagens dos níveis séricos de colesterol total, triglicérides, HDL e LDL segundo os diferentes grupos estudados ..... 57
Gráfico 8	Distribuição de valores de porcentagem de área de quantificação macroscópica de gordura corada pelo método <i>SUDAN IV</i> nas porções torácica e abdominal segundo os diferentes grupos estudados ..... 60
Gráfico 9	Distribuição de valores da análise da razão da quantidade de antígenos de <i>M. pneumoniae</i> versus de <i>C. pneumoniae</i> (MP/CP) e placa de aterosclerose nos segmentos torácico e abdominal, segundo os diferentes grupos estudados ..... 63



Gráfico 10 Distribuição de valores da análise da razão da quantidade de antígenos de *M. pneumoniae* versus de *C. pneumoniae* (MP/CP), lâmina elástica externa e placa de aterosclerose nos segmentos torácico e abdominal, segundo os diferentes grupos estudados 63

## LISTA DE TABELAS

	página
Tabela 1	Valores de média e desvio padrão de comprimento e largura das aortas dos três grupos, medidos em centímetros ..... 39
Tabela 2	Medidas descritivas das variáveis de interesse segundo cada grupo ..... 40
Tabela 3	Coeficientes de correlação (r) nos três grupos analisados nos segmentos torácico e abdominal das áreas das camadas íntima e adventícia da aorta, Variáveis correlacionadas: espessamento intimal vs agentes infecciosos ( <i>M.pneumoniae</i> e <i>C.pneumoniae</i> ); agentes infecciosos entre si; área da camada adventícia vs agentes infecciosos, considerando todos os animais (A+B+C) ..... 50
Tabela 4	Coeficientes de correlação (r) nos três grupos analisados nos segmentos torácico e abdominal nas camadas íntima e adventícia da aorta. Variáveis correlacionadas: Inflamação vs espessamento intimal; inflamação vs agentes infecciosos, considerando todos os animais (A+B+C) ..... 54
Tabela 5	Coeficientes de correlação (r) nos três grupos analisados conjuntamente no segmento torácico nas camadas íntima e adventícia da aorta. Variáveis correlacionadas: a) Colesterol total vs espessamento intimal; Colesterol total vs agentes infecciosos; b)Triglicérides vs espessamento intimal, Triglicérides vs agentes infecciosos; c) HDL vs espessamento intimal, HDL vs agentes infecciosos, d) LDL vs agentes infecciosos nos segmentos torácico e abdominal, considerando todos os animais (A+B+C) ..... 58
Tabela 6	Coeficientes de correlação (r) entre a porcentagem de área de gordura na superfície intimal <i>versus</i> as diferentes variáveis analisadas microscopicamente nos segmentos torácico e abdominal, considerando todos os animais (A+B+C) ..... 61

## LISTA DE QUADROS

	página
Quadro 1 Microrganismos implicados na associação de infecção e aterosclerose .....	9
Quadro 2 Anticorpos utilizados e suas respectivas diluições e fornecedores .....	35

## LISTA DE FIGURAS

	página	
Figura 1	Fotomicrografia de aorta de coelho representando delimitação manual da camada íntima para a medição da área ( $\mu\text{m}^2$ ) no analisador de imagens “Quantimet Leica”. (grupo B; aumento de 5x).	33
Figura 2	Fotomicrografias de segmentos de aortas de coelho representando o grupo C, ilustrando os tamanhos de placas nas porções torácica e abdominal. (H&E, A: Porção torácica, B: Porção abdominal, aumento de 10x)	42
Figura 3	Fotomicrografias de segmentos de aortas de coelho representando o grupo C, ilustrando os tipos de placas nas porções torácica e abdominal (H&E, A: Porção torácica, B: Porção abdominal , aumento de 10x)	44
Figura 4	Fotomicrografias de aortas de coelhos ilustrando evolução do quadro de aterosclerose experimental no segmento torácico. (H&E, A:Grupo A B: Grupo B. C:Grupo C, aumento 10x)...	46
Figura 5	Fotomicrografias de segmentos de aortas de coelhos coradas pela técnica de imunohistoquímica, para marcação de antígenos do <i>M. pneumoniae</i> , ilustrando uma forte marcação na camada íntima no grupo C ( em marrom) em contraste com uma leve marcação no grupo . (A:grupo A , B: grupo C, aumento 10x.)	47
Figura 6	Aortas de coelho mostrando a área de gordura macroscópica da camada íntima (segmento torácico) avaliada por detecção de cor pelo método histoquímico <i>SUDAN IV</i> . (A: grupo A, B: grupo B, C grupo C, aumento 10x)	59

*Resumo*



Fagundes R. *Estudo da co-participação da infecção natural pela Chlamydophila pneumoniae e Mycoplasma pneumoniae na aterogênese experimental em coelhos* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2006. 103 p.

Fatores de risco clássicos descritos como associados ao desenvolvimento da aterosclerose nem sempre conseguem explicar uma variabilidade da evolução da doença entre um indivíduo e outro. Evidências consistentes mostram que a inflamação exerce papel crucial na patogenia da aterosclerose. Recentemente, a infecção por alguns agentes, principalmente a *C. pneumoniae*, tem sido progressivamente aventada como possível fator colaborador no processo de aterogênese. O *Mycoplasma pneumoniae*, bactéria que utiliza colesterol para sua proliferação, foi descrito no interior de placas gordurosas humanas, conjuntamente com a *C.pneumoniae*. **Objetivo** - O presente estudo tem como objetivo verificar se antígenos dos agentes infecciosos *M. pneumoniae* e *C. pneumoniae* estão presentes na parede das artérias aortas normais dos coelhos, animal que tem sido freqüentemente utilizado no estudo da aterosclerose, e se a introdução de dieta rica em colesterol leva a proliferação desses microorganismos concomitante com o desenvolvimento da placa aterosclerótica e de inflamação. **Material e Métodos** - Foram estudados 39 coelhos da raça Nova Zelândia, divididos em três grupos conforme a alimentação: Grupo A – dieta normal, Grupo B – dieta com 1% de colesterol por 8 semanas e Grupo C – dieta com 1% de colesterol por 12 semanas. O colesterol total e frações foram dosados bioquimicamente, após sacrifício dos animais. Avaliou-se macroscopicamente a quantidade de placas de gordura na superfície da aorta através da coloração pelo Sudan IV e microscopicamente dois segmentos transversais: um torácico e um abdominal os quais foram submetidos a reações de Imunohistoquímica para antígenos infecciosos. **Resultados** - Antígenos da *C. pneumoniae* e *M. pneumoniae* estiveram presentes em todos os animais estudados, porém em quantidades progressivamente maiores nos grupos A, B e C. Houve forte correlação positiva entre a quantidade de antígenos infecciosos e espessura da camada íntima, inflamação e quantidade de gordura, à histologia tanto no segmento torácico quanto no abdominal. Houve correlação negativa entre perímetro do vaso e tamanho das placas no segmento torácico, cujas placas apresentaram maior porcentagem de fibrose comparadas com o segmento abdominal, indicando que as placas dessa região apresentam mais características evolutivas para placa estável, ou seja, remodelamento negativo do vaso e capa de fibrose. A intensidade da inflamação tanto na adventícia quanto na íntima se correlacionou positivamente à quantidade de ambos os patógenos reforçando a hipótese de que esses patógenos estão influenciando no desencadeamento da inflamação e desenvolvimento de aterosclerose. Os níveis plasmáticos de colesterol total e suas frações também se correlacionaram positivamente com os agentes infecciosos. **Em conclusão** – A alimentação rica em colesterol levou a aumento da intensidade de antígenos de *Mycoplasma pneumoniae* e *C. pneumoniae* presentes na íntima da aorta de coelhos, em correlação com aumento da espessura intimal e inflamação na parede do vaso, favorecendo de forma intensa a hipótese de

que esses agentes têm papel importante na aterogênese. A presença desses microorganismos em pequena quantidade nos animais controles reforça a idéia de que esses microorganismos são habitantes usuais de mamíferos e que fatores de risco tais como o colesterol induzem sua proliferação e o desenvolvimento da aterosclerose.

Descritores: 1.ARTEROSCLEROSE 2.INFECÇÃO 3.MYCOPLASMA  
4.CHLAMYDOPHILA PNEUMONIAE 5.COELHOS

*Summary*





Fagundes R. *Study of co-participation of natural infection by Chlamydophila pneumoniae e Mycoplasma pneumoniae at experimental atherogenesis in rabbits* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2006. 103p.

Classical risk factors described to be associated with the development of atherosclerosis do not completely explain the variability of the disease occurring among the individuals. Consistent evidences show that inflammation exerts a fundamental role in the pathogenesis and severity of atherosclerosis. Recently, some infectious agents, specially the *Chlamydophila pneumoniae* (*C.pneumoniae*), have progressively been claimed as possible factor acting in the progression of atherosclerosis. *Mycoplasma pneumoniae* (*M.pneumoniae*), a bacterium that needs cholesterol for proliferation, has been described in human fat plaques, in conjunction with *C.pneumoniae*. **Objective** – The present study has the objective of analyzing if *M. pneumoniae* and *C. pneumoniae* antigens are present at the rabbit aorta arterial walls, as the rabbit is an animal model frequently used in studies of atherosclerosis; and if the cholesterol enriched diet may cause proliferation of these microorganisms concomitantly with the development of atherosclerotic plaques and inflammation. **Material and Methods** – 39 aortas from New Zealand rabbits divided in three groups according to the diet were studied: Group A –normal dieta, Group B – 1% cholesterol enriched diet for 8 weeks and Group C – 1% cholesterol enriched diet for 12 weeks. The serum levels of total and fractions of cholesterol were biochemically measured after animals killed. A macroscopic study of the percentage area occupied by fat at the intimal aorta surface was performed, using the Sudan IV stain. A microscopic study was performed in two transversal segments: a thoracic and an abdominal one, which were submitted to immunohistochemistry for detection of these infectious agents. **Results** - *C. pneumoniae* and *M. pneumoniae* Ags were present in all studied animals, however in progressively higher amounts in groups A, B and C. There was a strong positive correlation between microscopic amounts of infectious antigens and intimal thickness, inflammation and intraplaque fat, both at the thoracic and abdominal segments. There was a negative correlation between vessel perimeter and plaque area at the thoracic segment, where the plaques presented higher percentage of fibrosis compared with the abdominal segment, suggesting that the thoracic region plaques have characteristics for progression to estabilization: negative remodeling of the vessel and fibrous cap. The quantity of Inflammation at both intima and adventitia correlated positively with these infectious agents, re-enforcing the hypothesis that infectious antigens are inducing inflammation and development of atherosclerosis. Serum levels of total cholesterol and their fractions also positively correlated with the amount of infectious antigens. In **conclusion** – A rich cholesterol diet caused an increase of *M. pneumoniae* and *C.pneumoniae* antigens at intima of rabbit aortas, in strong positive correlation with intimal thickness and inflammation of the aorta wall, favoring the hypothesis that these infectious agents have important role in atherogenesis. The presence of small amount of these microorganisms' antigens at the controls re-enforces the Idea that these microorganisms are usual inhabitants of mammals and that the risk

factors such as cholesterol induce their proliferation and acceleration of atherosclerogenesis.

Key words: 1.ATHEROSCLEROSIS 2.INFECTION 3.MYCOPLASMA  
4.CHLAMYDOPHILA PNEUMONIAE 5.RABBIT

# 1 *Introdução*



Complicações cardiovasculares conseqüentes à aterosclerose continuam sendo a maior causa de morbidade e mortalidade no mundo ocidental (Crouse, 1984; Campbel *et al.*, 1998; Ross, 1999; Grayston, 2000). Nos Estados Unidos, por exemplo, um terço dos óbitos anuais são atribuídos a esta doença. Tal enfermidade refere-se, genericamente, ao espessamento ou endurecimento das artérias, envolvendo acúmulo de colesterol, células inflamatórias, fibras musculares lisas e, por vezes, cálcio; acúmulo ao qual se dá o nome de placa de ateroma ou placa ateromatosa (Campbel, 1998; Kuo, 1998; Ross, 1999).

A aterosclerose pode apresentar fenômenos agudos de ruptura da placa e trombose caracterizando um processo mórbido, com um longo período de incubação, iniciando-se nos primeiros anos de vida e apresentando complicações agudas décadas mais tarde (Libby, 2005). É também uma doença de acometimento difuso, sendo os sistemas cerebral e coronário, assim como a artéria aorta, os locais onde tal processo leva a maiores quadros clínicos mórbidos representados por infartos do miocárdio e cerebrais (acidentes vasculares cerebrais); cardiopatia isquêmica crônica, gangrena das pernas, oclusão mesentérica e encefalopatia isquêmica (Aikawa, Libby, 2004).

A aterosclerose tem sido registrada nos seres humanos há milênios. Suas lesões foram identificadas até mesmo em múmias egípcias. Em meados do século dezenove, Virchow sugeriu que um tipo de agressão à parede arterial associada a uma resposta inflamatória resultasse na lesão da aterosclerose (Libby, 2001).

No Brasil, a doença aterosclerótica representa a principal causa de morte (MS/FUNASA/Cenepi) e, em todo mundo, tem provocado a morte de mais de 19 milhões de pessoas, a cada ano, por vezes sem sintomas prévios (Myerburg *et al.*, 1997; *American Heart Association*, 2002). Os métodos de diagnósticos preventivos são ainda insuficientes para identificar as vítimas (Nagavi *et al.*, 2003 a, b).

A aterosclerose é uma doença de evolução gradual, cujo processo tem início em idade precoce, bastante prevalente na população em geral, de tal forma que ao atingir a idade adulta, a maioria dos homens (e as mulheres em menor escala) apresenta evidências da doença nas artérias coronárias (Ross, 1993; 1999; Nagavi, 2003 a, b).

Estudos populacionais como o coordenado por McGill (*International Atherosclerosis Project--IAP*) comparou os achados anatomopatológicos de New Orleans com os de outros 14 países. O IAP representou possivelmente a mais ampla investigação dessa natureza, utilizando 23.207 segmentos de aorta e artérias coronárias, coletados de pessoas entre dez e 69 anos de idade, através do estabelecimento de um rigoroso protocolo (Gurmán *et al.*, 1968).

Os achados fundamentais do IAP foram: 1º) a aorta é o primeiro vaso a ser atingido, o que se dá na infância, com o aparecimento das estrias gordurosas que aumentam rapidamente na puberdade; 2º) as estrias gordurosas surgem nas artérias coronárias apenas na adolescência e na juventude; 3º) nas populações de alto risco, as estrias gordurosas podem se transformar em placas fibrosas no fim da segunda ou da terceira década de vida; 4º) as estrias gordurosas surgem nas artérias carótidas aproximadamente na mesma faixa etária que na aorta, ao passo que as artérias cerebrais começam a apresentar tais lesões mais tardiamente, em idade semelhante à do surgimento das lesões nas coronárias. As placas fibrosas surgem nas artérias carótidas no mesmo período em que aparecem na aorta, enquanto que, nas artérias vertebrais e intracranianas, surgem bem mais tarde.

Como o elevado nível plasmático de lipoproteína de baixa densidade (LDL) encontra-se entre os principais fatores de risco para a aterosclerose (Steinberg *et al.*, 1989; Witztum, 1994), por muitos anos, esta doença foi considerada um processo de simples deposição de lipídios, acometendo várias camadas da parede vascular de forma sistêmica, porém irregular, determinando graus variáveis de estenose (Esporcatte, 2004).

Com os avanços tecnológicos, a hipótese proposta por Virchow em 1856 (*apud* Libby, 2001) de que a aterosclerose é uma resposta do vaso à injúria, ressurgiu em 1976 (Ross, 1999), correspondendo a um processo inflamatório e proliferativo localizado, associado a acúmulo de substâncias

---

do plasma e crescimento de células musculares lisas (Jander, 1998; Ross, 1999).

Estudos experimentais e clínicos mais recentes têm questionado esta visão passiva da aterogênese e da placa aterosclerótica em favor de um processo muito mais dinâmico em que inúmeros mediadores habitualmente relacionados à inflamação, locais ou sistêmicos vêm sendo sugeridos estar diretamente relacionados não apenas à instalação, mas também à progressão, estabilização ou instabilização da placa aterosclerótica (Tracy, 1998; Ross, 1999; Mullenix, 2005).

A injúria e disfunção endoteliais parecem ser as responsáveis pelo início da aterogênese, porém o que determina a lesão, dentro do conceito clássico da aterosclerose como uma “resposta à injúria”, é o desenvolvimento da inflamação (Ross, 1953; Ross, 1976). É sabido que qualquer perturbação na função endotelial pode amplificar muito a resposta inflamatória (Mullenix, 2005).

A descoberta da via metabólica e dos receptores das LDL (Goldstein, Brown, 1977, 1983) e a hipótese oxidativa da aterosclerose, segundo a qual a LDL oxidada é de fundamental importância na patogênese da aterosclerose (Steinberg *et al.*, 1989; Witztum, 1994), também contribuíram para esse conceito atual de que a aterosclerose é secundária às lesões sofridas pelo endotélio. Assim, os agentes injuriantes, dentre outros fatores de risco, podem ser: lipoproteínas oxidadas de baixa densidade (LDL), radicais livres induzidos por tabaco, estados hiperglicêmicos, elevação dos níveis sistêmicos tensionais, forças hemodinâmicas sobre o endotélio (*shear*

*stress*), aumento de homocisteína circulante, hereditariedade, entre outros. Estes fatores considerados clássicos (Ross, 1993), isolados ou em conjunto, provocam a disfunção do endotélio e facilitam a penetração, no espaço subendotelial, de substâncias presentes no plasma (Ross, 1999; Suwa *et al.*, 2002).

O processo tem início com o influxo de monócitos/macrófagos da circulação para o espaço subendotelial do vaso onde eles passam a englobar as lipoproteínas presentes no espaço extracelular, tornando-se globosos, formando as chamadas células xantomatosas (Campbel, 1998; Kuo, 1998). As lesões em formação podem progredir com o influxo adicional de monócitos e linfócitos T que levam a liberação de citocinas (Mosorin *et al.*, 2000). Os produtos dessas células inflamatórias e das células endoteliais induzem proliferação e migração de células musculares lisas da média para a íntima (Crouse, 1984; Noll, 1998), as quais passam a sintetizar colágeno, levando à formação da capa fibrótica e do ateroma que, desta forma, cresce em direção à luz do vaso (De Boer, 2000). Ocorre um balanço entre a síntese e o catabolismo da matriz extracelular através da ação das enzimas conhecidas como metaloproteinases (Dollery, 1995).

Conforme ocorre aumento do volume da placa, há necessidade, nesta, de uma microcirculação para permitir o tráfego de leucócitos e o crescimento da placa pela difusão de oxigênio e nutrientes. Assim, durante o crescimento da placa, surge um plexo de vasos neoformados (O'Brien *et al.*, 1994), em resposta a peptídeos angiogênicos expressos na placa ateromatosa (Vasse *et al.*, 1999). Pode ocorrer, ainda, a calcificação de



áreas durante a evolução. Algumas subpopulações de células musculares lisas podem promover a calcificação pelo aumento de secreção de citocinas (Libby, 2001).

Eventos clínicos agudos resultam de hemorragias no interior da placa ou ruptura da capa de fibrose com exposição do conteúdo gorduroso para a luz, acarretando processo de trombose e oclusão do vaso estenosado (Schmitz, 1998; Ross, 1999; Nicoletti, 2000).

Um dos aspectos intrigantes da doença aterosclerótica é o fato dela ocorrer em focos, formando placas com intensidades de características diversas de uma placa para outra. Os fatores de risco considerados acima não conseguem explicar essa diversidade de morfologia das placas em um mesmo indivíduo. A participação de agentes infecciosos (Saikku *et al.*, 1988; Ross, 1999; Gupta, 1999; Fong, 2000a; Rupprecht, 2001; Ezzahiri *et al.*, 2002) no processo de aterogênese, vem sendo progressivamente mais e mais documentada e poderia explicar o aspecto multifocal e a diversidade de intensidade de lesões ao longo da árvore arterial (Gupta, 1998; Gupta, 1999; Ngeh, Gupta, 2000; Aalto-Setälä *et al.*, 2001). A presença de agentes infecciosos seria uma explicação bastante convidativa para justificar a formação de radicais livres e oxidação de lípidos (Gupta, 1998; Shor, Phillips, 1999).

Os agentes infecciosos, juntamente com a formação de radicais livres e lípidos oxidados provocariam o acúmulo de células inflamatórias. Estas, por sua vez, apresentam uma variedade de ações pró-aterogênicas, incluindo indução de moléculas de adesão e produção de citocinas, enzimas

proteolíticas e fatores de crescimento (Hansson, 1998). A importância do linfócito T nas lesões foi demonstrada por Mach *et al.* (1998). Agentes infecciosos como o citomegalovírus (CMV), *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), *Mycoplasma pneumoniae* (*M. pneumoniae*), *Chlamydomphila pneumoniae* (*C. pneumoniae*) e bactérias causadoras de infecções periodontais associados à aterosclerose (Saikku *et al.*, 1988; Boehler *et al.*, 1994; Danesh *et al.*, 1997; Campbel, Kuo, 1998; Ross, 1999; Gupta, 1999; Valtonen, 1999; Fong, 2000; Mayr *et al.*, 2000; Aalto-Setala *et al.*, 2001; Ezzahiri *et al.*, 2002) podem interagir com os fatores clássicos de forma sinérgica (Ross, 1999; Ngeh, Gupta, 2001; Rupprecht, 2001).

Evidências da participação de agentes infecciosos têm sido documentadas por diferentes enfoques:

- 1) Dados soroepidemiológicos,
- 2) Identificação direta dos microorganismos em placas ateroscleróticas,
- 3) Demonstração da habilidade dos microorganismos em induzir respostas pró-trombóticas em células (monócitos/macrófagos, linfócitos T, células endoteliais e musculares lisas),
- 4) Modelos animais apresentando indução ou aceleração de aterosclerose por vírus ou bactérias,
- 5) Intervenções preliminares de antibióticos anti-chlamydomphila (Gupta, 1998; Ngeh, 2000; Ngeh, Gupta, 2001a, b).

São numerosos os agentes específicos relacionados à aterosclerose (Ngeh, 2000). Os três mais investigados neste contexto são Citomegalovírus, *Chlamydomphila pneumoniae* e *Helicobacter pylori* (Gupta, 1999). (**Quadro 1**, Ngeh, 2000).

**Quadro 1** - Microrganismos implicados na associação de infecção e aterosclerose

Microrganismo	Autor e ano da publicação
<i>Bacillus typhosus</i>	1889, Gilbert and Lion
Streptococci	1931, Benson <i>et al.</i>
Coxsackie B vírus	1968, Sohal <i>et al.</i>
Adenovirus	1973, Fabricant <i>et al.</i>
<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	1973, Clyde and Thomas.
Marek's disease vírus	1978, Fabricant <i>et al.</i>
Cytomegalovirus	1987, Petrie <i>et al.</i>
Herpes simplex vírus	1987, Hajjar <i>et al.</i>
<i>C. pneumoniae</i>	1988, Saikku <i>et al.</i>
Measles vírus	1990, Csonka <i>et al.</i>
Eptein-Barr vírus	1993, Straka <i>et al.</i>
Human immunodeficiency vírus	1993, Paton <i>et al.</i>
<i>H. pylori</i>	1994, Mendall <i>et al.</i>
<i>Mycoplasma fermentans</i>	1996, Ong <i>et al.</i>
<i>Coxiela burnetti</i>	1999, Lovey <i>et al.</i>
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	1999, Chiu <i>et al.</i>
<i>Streptococcu sagüis</i>	1999, Chiu <i>et al.</i>
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	2000, Haraszthy <i>et al.</i>
<i>Bacteróides forsythus</i>	2000, Haraszthy <i>et al.</i>
Hepatitis A vírus	2000, Zhu <i>et al.</i>
Influenza vírus	2000, Nagavi <i>et al.</i>
<i>Prevotella intermedia</i>	2000, Haraszthy <i>et al.</i>

Adaptada e modificada de Ngeh J. *Chlamydomphila pneumoniae* em Elderly Patients with stroke study (CPEPS): a case-control study on the seroprevalence of *C. pneumoniae* in patients aged over 65 years admitted with acute stroke or transiente ischaemic attack. MSc dissertation, University of Keele, UK, 2000.

Todas as referências podem ser encontradas em Ngeh (2000).

A idéia que a inflamação é um fator importante na aterogênese e na síndrome coronariana (Buja, 1996; Metha *et al.*, 1998) e que possa estar relacionada à infecção por patógenos, os quais seriam estímulos inflamatórios para iniciar e manter o processo aterosclerótico (Matilla, 1989), vem sendo bastante discutida nos últimos anos. No entanto, o assunto ainda é bastante controverso. Mesmo a progressiva documentação sobre a presença de agentes infecciosos nas placas ateroscleróticas não tem conseguido esclarecer o papel desses agentes no processo: se seriam agentes ativos na aterogênese e no desencadeamento de inflamação e ruptura de placa, ou se seriam habitantes passivos das placas (Saikku *et al.*, 1988; Mahony, Vink *et al.*, 2001).

A infecção pelo Citomegalovírus (CMV) humano, maior causa de morbidade e mortalidade em indivíduos imunocomprometidos (Macher *et al.*, 1983; Boehler *et al.*, 1994; Vliegen *et al.*, 2002), tem sido sugerida estar associada à aterosclerose acelerada após o transplante cardíaco (Fong, 2002). Minick *et al.* (1979) detectaram na doença de Marek que o herpesvírus aviário possivelmente estava relacionado ao surgimento da aterosclerose em galinhas. A partir de então o papel do CMV e de outros herpesvírus ganhou interesse na progressão da doença cardíaca (Minick *et al.*, 1979). O CMV, *in vitro*, parece estimular a proliferação e migração de células de músculo liso e *in vivo* favorecer a transferência de gene em artérias carótidas normais (Streblow *et al.*, 1999).

*Helicobacter pylori*, bactéria que pode causar a úlcera péptica, também foi apontada como um dos microorganismos envolvidos no

desenvolvimento da aterosclerose pelo achado de alta prevalência de *H. pylori* em pacientes com doença arterial coronária, infarto do miocárdio ou doença cerebrovascular. E também, por coincidência entre infecção por *H. pylori* e fatores de riscos cardiovasculares tais como: elevação dos níveis de colesterol, triglicérides e fibrinogênio plasmático bem como correlação com as proteínas da fase aguda, como a proteína C-reativa. Há estudos moleculares com identificação do DNA do *H. pylori* nos ateromas apontando um envolvimento direto dessa bactéria na progressão e instabilidade das placas ateroscleróticas (Martinez, 2002; Gaensly, 2002; Kowalski *et al.*, 2002).

*Chlamydomphila pneumoniae* (CP) é um patógeno respiratório humano responsável por 5-20% dos casos adquiridos de pneumonia, bronquite e sinusite (Cook, 1994; Kuo *et al.*, 1995). Foi isolada pela primeira vez como TW em Taiwan em 1965, e depois, como AR-39, em 1983, em Seattle. Em 1986 foi descrita como uma causa de infecção aguda do trato respiratório, e recebeu o nome de TWAR (Taiwan acute respiratory) (Grayston *et al.*, 1986; Grayston *et al.*, 1989). TWAR foi mais tarde declarada como uma nova espécie de *Chlamydia* e renomeada de *Chlamydia pneumoniae* em 1989. A prevalência de anticorpos contra *C. pneumoniae* na população alcança em torno de 50% na idade de 20 anos e 80% na idade de 80 anos (Aldous *et al.*, 1992; Ngeh *et al.*, 2001; Kuo, Campbel, 2002). Trata-se de uma bactéria gram negativa intracelular obrigatória que depende de um hospedeiro para gerar ATP, já que ela não o produz. Além das células de faringe, árvore brônquica e trato genito-urinário, o microorganismo pode infectar outros tipos

celulares, incluindo macrófagos, células endoteliais e células de músculo liso da parede arterial (Cook, 1994; Kuo, Campbel, 2002).

As principais evidências que associam a *C. pneumoniae* à doença cardiovascular serão descritas. A primeira sugestão foi proposta por Saikku *et al.*, em 1988, demonstrando uma associação soro-epidemiológica de anticorpos anti-*C. pneumoniae* com infarto do miocárdio e doença coronária. Em seguida surgiram estudos soro-epidemiológicos com a detecção direta do antígeno ou do DNA da bactéria ou ambos, e isolamento do microorganismo de lesões ateroscleróticas (Saikku *et al.*, 1988; Kuo *et al.*, 1995; Fong *et al.*, 1997; Muhlestein *et al.*, 1998; Ross, 1999; Rosenfeld *et al.*, 2000; Grayston, 2000; Blessing *et al.*, 2001; Campbel, Kuo, 2002).

Investigadores demonstraram uma associação entre infecção por *C. pneumoniae* e aneurismas de aorta abdominal (AAA) (Lindholt, 2001). Esses autores encontraram correlação positiva entre expansão e progressão de AAA com IgA e IgG de *C. pneumoniae* (Lindholt, 2001; Vammen *et al.*, 2001). Técnicas como PCR (polymerase chain reaction) imunohistoquímica, microscopia eletrônica, e cultivo do organismo apresentaram evidências da presença de *C. pneumoniae* em lesões ateroscleróticas (Kuo, Campbel, 2000).

Kuo C. e colaboradores em uma série de estudos detectaram *C. pneumoniae* em 148 (54%) de 272 tecidos ateroscleróticos testados; o microorganismo não foi encontrado em nenhuma das 52 artérias normais testadas. A Clamídia tem sido detectada mais freqüentemente em lesões ateroscleróticas do que em outros tecidos do organismo do mesmo

hospedeiro, sugerindo um tropismo do organismo por ateromas (Saikku *et al.*, 1988; Campbel *et al.*, 1998; Grayston, 2000). Em estudo com utilização de imunohistoquímica e PCR detectou-se a *C. pneumoniae* em 21 (55%) dos 38 pacientes examinados. Dos pacientes positivos 52% apresentaram o microorganismo apenas no tecido cardiovascular 33% em tecido cardiovascular e não-cardiovascular e 14% em tecido não-cardiovascular (principalmente nos pulmões) (Muhlestein *et al.*, 1998).

Os mecanismos iniciais do desenvolvimento da lesão aterosclerótica incluem injúria ou ativação endotelial que pode se desencadear por múltiplos fatores. Em inóculo intranasal ou intraperitoneal de camundongos com *C. pneumoniae* o microorganismo foi detectado por PCR em macrófagos alveolares e peritoneais e ainda em células mononucleares de sangue periférico (Kuo, Campbel, 2002). Kuo e colaboradores, 1995, por uma transferência passiva de macrófagos alveolares ou peritoneais infectados para uma cavidade não-infectada de camundongo, encontraram usando a mesma técnica a bactéria *C. pneumoniae* nos pulmões, timo, baço e/ou linfonodos abdominais. Essas seriam evidências de que os monócitos/macrófagos provavelmente funcionam como veículo para a disseminação da infecção por *Chlamydomphila pneumoniae* do tecido pulmonar para placas ateromatosas (Fong, 1997). É importante entender a habilidade desse microrganismo em causar infecção local e inflamação da parede vascular, caracterizadas pelo influxo de leucócitos, consistindo principalmente de monócitos e linfócitos T. Quando linfócitos T são ativados, podem atuar como uma fonte de citocinas pró-aterogênicas, contribuindo

assim com a progressão da formação da lesão nas camadas de gordura da placa aterosclerótica (de Boer, 2000). A presença de *C. pneumoniae* em lesões não prova que exista um papel significativo na aterogênese (Kuo, 1999). É possível que, quando presente na lesão, a *C. pneumoniae* cause inflamação crônica e assim perpetue a aterogênese (Kuo, 1999).

Trabalhos desenvolvidos no InCor–HCFMUSP (Higuchi *et al.*, 2000a), utilizando técnicas de imunohistoquímica, hibridização *in situ* e microscopia eletrônica, mostraram grande quantidade de bactérias *C. pneumoniae* no interior das placas, na camada média e, principalmente, na adventícia de segmentos de artérias coronárias com placas rotas. Porém, a *C. pneumoniae* esteve presente também, porém em pequena quantidade, em segmentos coronarianos com placas estáveis ou sem aterosclerose, principalmente na adventícia. Isto sugere que a *C. pneumoniae* é um agente infeccioso comum na adventícia dos vasos e que sua proliferação aumentada poderia gerar inflamação da parede vascular e, assim, contribuir para remodelamento e instabilidade do vaso.

Os mesmos pesquisadores (Higuchi *et al.*, 2000 b), em seqüência aos estudos acima relatados, observaram que, além da *C. pneumoniae*, outra bactéria está presente nas placas de ateromas instáveis: o *Mycoplasma pneumoniae*.

Os micoplasmas, considerados os menores microorganismos de vida livre, têm como *habitat* primário superfícies das mucosas oral e ocular, tratos respiratório, urogenital e digestório dos animais e do homem, no qual foram isoladas 16 espécies. Os primeiros relatos de micoplasmas como agentes



---

infecciosos foram publicados entre 1930 e 1940. É agente etiológico da pneumonia atípica (Krause, Taylor, 1922).

Os micoplasmas fazem parte de um grande grupo de procariontes com mais de 190 espécies (Timenetsky, 2000), distinguindo-se das demais por ser a menor bactéria autoreplicante, possuindo diminuto genoma e por apresentar características únicas, como ausência de parede externa e necessidade de colesterol para sua sobrevivência (Razin *et al.*, 1998). Devido à sua limitada capacidade de biossíntese, algumas espécies são parasitas estritos de hospedeiros e tecidos específicos (Razin, 1998). Outra característica importante é que ele induz alterações no sistema imunológico do hospedeiro, as quais podem favorecer a proliferação de outros agentes infecciosos.

Em animais de laboratório, o *M. pulmonis* é bastante freqüente, sendo causador da micoplasmose respiratória murina.

Para o homem, considera-se que o *M. pneumoniae* (MP) é um patógeno primário importante, causando pneumonia e outras doenças do trato respiratório, tais como traqueobronquites e faringites (Baseman *et al.*, 1975; Jacobs, 1991), bem como manifestações extrapulmonares, síndromes hematopoiéticas, acometimento do sistema nervoso central, articulações, fígado, pâncreas e síndromes cardiovasculares. Esses microorganismos causam diversos efeitos, como alteração do metabolismo, diminuição na taxa de divisão celular pela interferência na síntese de DNA, RNA e proteínas, aberrações cromossômicas e morte com desprendimento da monocamada. Além disso, podem induzir a redistribuição e modificação dos

antígenos de superfície da célula hospedeira, interferindo na propagação de vírus (Razin, 2001). Os micoplasmas normalmente provocam infecções crônicas ou de longa duração. Isto sugere que essas bactérias possuem um mecanismo de escape à resposta do sistema imune do hospedeiro, em decorrência seja da variação das proteínas de superfície, seja na capacidade de provocar alterações nos constituintes imunológicos, alterações essas que envolvem reações imunológicas específicas e não-específicas (Brade, 1999).

Mecanismos de defesa específicos incluem a produção tanto local quanto sistêmica de anticorpos de diferentes classes e subclasses, estimulação de imunidade celular mediada, opsonização e fagocitose dos organismos (Abbas, 1994). Os micoplasmas afetam o sistema imune podendo induzir tanto a supressão quanto a estimulação de linfócitos T e B, produzindo citocinas, elevando a citotoxicidade de macrófagos, células “natural killers” e células T, aumentando a expressão de células receptoras e ativando a cascata do complemento.

Tanto a bactéria inteira, como a sua lipoproteína de membrana, parecem ter capacidade de ativar monócitos e têm papel importante na resposta inflamatória durante a infecção (Chambaud, 1999).

O *M. pulmonis* e o *M. pneumoniae* demonstraram capacidade de provocar efeitos supressores nos macrófagos alveolares, inibindo as atividades de fagocitose por provável atuação do LPS (lipopolysaccharide) da cápsula do micoplasma, interferindo assim no fator de necrose tumoral (TNF) e na produção de interleucinas (IL-1, IL-6), estimulando a resposta

imune primária timo-independente, permitindo dessa forma a ocorrência de infecções crônicas pela dificuldade da eliminação dos micoplasmas e outros micorganismos (Timenetsky, Metiffogo, 2000). A habilidade dos micoplasmas em imunomodular um hospedeiro não-imune responsivo contribui para suas propriedades patogênicas, permitindo que escapem dos mecanismos de defesa do hospedeiro, ou os suprimam, estabelecendo assim uma infecção crônica, persistente (Timenetsky, Metiffogo, 2000).

*M.pneumoniae* possui uma expansão polar com core eletro denso, com função de aderência, o que auxilia na motilidade. Permanece ainda a dúvida se micoplasmas aderem à superfície das células ou as invadem (Razin *et al.*, 1998). A falta de parede celular permite um contato íntimo entre a membrana do micoplasma e a membrana da célula hospedeira e, em condições apropriadas, pode ocorrer fusão celular. Durante o processo de fusão, os componentes do micoplasma são liberados dentro da célula hospedeira e afetam as funções normais da célula, devido à ação de enzimas da bactéria, dentre as quais as nucleases (Timenetsky, 1998), que podem degradar o DNA da célula hospedeira.

Estudos prévios desenvolvidos no InCor mostraram que segmentos de artérias coronárias humanas contendo placas rotas, trombosadas e que causaram infarto do miocárdio, apresentavam grande quantidade de *M. pneumoniae* e *C. pneumoniae* (Higuchi *et al.*, 2000). Houve uma correlação positiva significativa entre a quantidade de *C. pneumoniae* e o número de células inflamatórias positivas anti *C. pneumoniae* na placa e na adventícia, sugerindo uma relação de causa e efeito. As placas vulneráveis que se

associam a eventos isquêmicos agudos são caracteristicamente volumosas, com grande conteúdo de colesterol. Isto pode explicar o crescimento de expressiva quantidade de micoplasmas nesse local. Por outro lado, a presença de micoplasmas pode facilitar o crescimento de *C. pneumoniae* co-existente nessa região.

Em trabalhos subseqüentes, com a hipótese de que a associação de *C.pneumoniae* e *M.pneumoniae* poderia aumentar a virulência da clamídia, favorecendo a sua proliferação, inflamação da placa e possível ruptura, foi constatada a presença das duas bactérias na superfície do *vasa vasorum*, nas células da placa ateromatosa e no interstício de placas vulneráveis. Os resultados, de uma forma geral, apontaram para uma participação do *M.pneumoniae* na patogênese da aterosclerose e sua íntima associação com *C.pneumoniae* poderia ser um dos fatores a causar arterite localizada na coronária, ruptura da placa e conseqüente infarto agudo do miocárdio (Higuchi *et al.*, 2000, 2002).

*M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*, inflamação e fatores de crescimento estiveram presentes em lesões ateroscleróticas iniciais, em fragmentos de biópsia de aorta ascendente, sugerindo fortemente um papel patogénico para essas duas bactérias no desenvolvimento da aterosclerose (Góis, 2006). Nesse trabalho os autores mostraram que a predominância de *C. pneumoniae* em relação ao *M. pneumoniae* pode ser um fator para progressão da placa e que fatores de crescimento podem ser importantes para a estabilidade da placa.

Co-infecção por *C. pneumoniae* e *M. pulmonis* foi observada em colônia de ratos convencionais assintomáticos, os quais apresentavam enzimas hepáticas elevadas no soro, sugerindo que a associação entre micoplasma e clamídia também está presente em animais, levando a lesões crônicas subclínicas (Damy *et al.*, 2003).

Para que se consiga esclarecer melhor a relação entre a doença aterosclerótica e microorganismos há necessidade de que essa relação também exista nos modelos animais experimentais.

Observações em humanos enriquecem consideravelmente os estudos, porém por razões éticas óbvias nossa capacidade em comprovar essas hipóteses na espécie humana é bastante limitada (Rekhter, 2002).

As aves foram os primeiros animais a serem usados no estudo de aterosclerose (Clair, 1998). A doença de Marek, provocada por um herpesvirus, exacerba a aterosclerose em frangos (Hajjar, 1986). Já foram utilizados também primatas (Clarkson 1998) e camundongos (Vesselinovitch, 1968; Thompson, 1969; Roberts, 1976; Paigen *et al.*, 1985, Paigen *et al.* 1987a; Paigen *et al.*, 1987b; Leboeuf *et al.*, 1990)

Coelhos têm sido considerados bons modelos para desenvolvimento de aterosclerose experimental (Kuo *et al.*, 1995; Fong, 1997; Laitinen *et al.*, 1997; Muhlestein *et al.*, 1998; Higuchi *et al.*, 2000; Rekhter, 2002; Fong *et al.*, 2002). Esses animais vêm sendo amplamente utilizados para estudos de aterosclerose desde o início do século XX, quando em 1908 Ignatowski reportou aumento da camada íntima com administração de dieta exclusiva

de proteínas de origem animal (carne, leite, ovos). Anitschkow em 1913 (Finging, 1997) demonstrou que ao alimentar os animais com dieta rica em colesterol causava-se alterações ateroscleróticas na íntima arterial do coelho semelhantes à aterosclerose humana (Laitinen *et al.*, 1997; Finging *et al.*, 1997; Libby, 2001). A doença é usualmente induzida em coelhos da raça Nova Zelândia normais com dietas contendo lípides ou proteínas ou através de lesões mecânicas nas artérias (Dayley *et al.*, 1994; Finging *et al.*, 1997). O coelho como modelo tem algumas vantagens em experimentos com infecção do animal com *C. pneumoniae*. Por exemplo, é rara a infecção por outras bactérias e as lesões aparecem rapidamente (em algumas semanas) com evidências histológicas. A desvantagem seria o alto custo de manutenção, assim como dificuldade de se trabalhar com um grande número de animais (Fong, 2000b).

Em estudo ainda não publicado verificamos que colônias de coelhos da raça Nova Zelândia apresentam com freqüência quadros de bronquite e pneumonite crônicos, apresentando nas células dos septos alveolares e nas células mesoteliais positividade para antígenos da *C. pneumoniae* e de *M. pneumoniae*. Nos epitélios de revestimento brônquico, a positividade anti-antígenos de *M. pneumoniae* foi intensa. Sabendo que micoplasmas proliferam na presença de colesterol e que também favorecem a proliferação de outros agentes infecciosos, a proposta do presente trabalho foi demonstrar uma possível participação de *C. pneumoniae* e *M. pneumoniae* pré-existentes na parede da artéria aorta de coelhos analisando se ocorre aumento proporcional de antígenos desses agentes infecciosos conforme se

desenvolvem as placas de ateromas no animal submetido à dieta rica em colesterol.

## *2 Objetivos*

---

---



---

O presente trabalho tem como objetivo principal verificar se *Mycoplasma pneumoniae* e *Chlamydothila pneumoniae* previamente existentes na parede dos vasos podem estar relacionados à intensidade de desenvolvimento de placas de ateromas na vigência de dieta rica em colesterol. Como objetivos específicos procuramos:

- 2.1- Verificar se a intensidade da aterosclerose experimental, que se desenvolve pela administração de dieta rica em colesterol administrada a coelhos, está relacionada à intensidade local de infecção pré-existente por *Mycoplasma pneumoniae* e *Chlamydothila pneumoniae* na aorta desses animais, procurando observar possíveis correlações entre quantidade de antígenos desses agentes infecciosos com quantidade de células inflamatórias e tamanho das placas de ateroma;
- 2.2- Verificar se a quantidade de um desses tipos de agentes infecciosos está relacionada a menor fibrose no ateroma, a qual, é uma característica de instabilização da placa;

- 2.3 Verificar se possíveis diferenças de intensidade aterosclerótica entre o segmento torácico e o segmento abdominal podem estar relacionadas com diferenças de quantidade de *M. pneumoniae* e *C. pneumoniae* pré-existentes nessas regiões;
- 2.4- Verificar se há relação entre os níveis séricos de colesterol, suas frações e triglicérides e a quantidade de *M. pneumoniae* e *C. pneumoniae*.

### 3 *Métodos*



### 3.1 MATERIAL

#### 3.1.1 Animais

Nesta pesquisa foram estudados 39 coelhos da raça Nova Zelândia (*White New Zealand*), provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina –USP, com 60 dias de idade aproximadamente, machos e pesando de  $2,2 \pm 0,5$  kg. Os mesmos foram acondicionados em gaioleiros de aço inoxidável adequados à espécie no Biotério da Disciplina de Técnica Cirúrgica e Cirurgia da Faculdade de Medicina –USP, mantidos com ração específica para a espécie e água *ad libitum*, com intervalos de luz e escuridão a cada 14/10 horas e temperatura ambiente de aproximadamente 22°C.

Os coelhos foram divididos em 3 grupos:

**Grupo A – Grupo Controle Normal** composto de 13 coelhos alimentados com dieta normal e com formulação adequada para a espécie, conforme descrição abaixo. Esses animais foram sacrificados na oitava semana, a partir da data de chegada.

**Grupo B – Grupo com dieta hipercolesterolêmica 8 semanas:** composto por 13 coelhos alimentados com a dieta do grupo A enriquecida com 1% de colesterol conforme descrição abaixo, durante 8 semanas.

**Grupo C – Grupo com dieta hipercolesterolêmica 12 semanas:** composto por 13 coelhos alimentados com dieta enriquecida com 1% de colesterol, durante 12 semanas.

### **3.2 METODOLOGIA**

Todos os procedimentos envolvendo a experimentação com os animais foram realizados de acordo com princípios éticos estabelecidos internacionalmente (NRC, 1996).

O protocolo de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do HC-FMUSP e Comissão Científica e de Ética do Instituto do Coração.

O período dedicado aos animais estendeu-se de abril de 2003 a março de 2004.

### **3.2.1 Confeção da dieta**

Os animais alimentaram-se inicialmente de ração para coelhos Nuvilab®, do laboratório Nuvital, Curitiba, PR. Brasil.

Para obter a dieta hipercolesterolêmica, foram adicionados 10 g de colesterol em pó (Sigma – C 8503 – 95% de pureza USP) a cada quilo de ração comercial. O colesterol foi dissolvido em uma mistura de 50 ml de éter etílico (Casa da Química Ind. Com Ltda. Diadema-S. P.) e 100 ml de álcool etílico 70°(Divisão de Farmácia. HC-FMUSP) e, em seguida, adicionado à ração por pulverização. A ração permaneceu em cubas apropriadas para evaporação do conteúdo volátil da mistura durante 24 horas.

Cada animal recebeu diariamente 150 g de ração, aproximadamente e tal consumo foi controlado por pesagem diária.

### **3.2.2 Coleta de sangue e métodos laboratoriais**

No início do experimento foi coletada, por punção intracardíaca, amostra de 10 ml de sangue, dos animais para dosagem bioquímica do colesterol total e frações, o que se constituiu nos valores de referência normal para este experimento.

No final de cada experimento, de cada animal a ser estudado, foi coletada uma amostra de sangue para dosagem bioquímica do colesterol total e frações. Dos coelhos previamente anestesiados com ketamina 25-50 mg/kg associado a xilazina 2-5 mg/kg via intramuscular, o sangue colhido

por punção intracardíaca, foi centrifugado a 2000 rpm e o soro obtido, fracionado, acondicionado em microtubos-Eppendorf® e mantido à temperatura de - 32°C.

O colesterol total e o HDL (high density lipoproteins) foram dosados pelo método enzimático CHOD-PAP (Merck®, E.U.A.) e os níveis séricos de HDL, medidos após precipitação com ácido fosfotúngstico e cloreto de magnésio. O valor do LDL foi calculado pela fórmula de FRIEDWALD e os valores dos triglicérides foram calculados, por método enzimático de cor (GPO-PAP) com uso do aparelho Cobas Mira (Roche®).

As dosagens de lípidos foram realizadas no Laboratório Clínico do InCor-HC FMUSP, todos com referências conforme as Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemias . Quando houve mais de uma medida, foi calculada a média destas e esse valor, tomado como referencial para o caso.

### **3.2.3 Sacrifício dos animais**

O sacrifício foi realizado após pesagem dos animais com injeção prévia de anestésicos (ketamina 25-50 mg/kg associado a xilazina 2-5 mg/kg via intramuscular), cuja ação foi aprofundada com barbitúrico (Tiopental) e administração de cloreto de potássio 3ml, via intracardíaca.

Os animais foram imediatamente submetidos a necrópsia e a aorta, retirada na íntegra, juntamente com todo o monobloco dos órgãos.

### 3.2.4 Estudo anatomopatológico

#### 3.2.4.1 Preparo da aorta

A aorta foi dissecada do monobloco, seccionada à altura do arco aórtico e da bifurcação ilíaca. A artéria foi em seguida aberta longitudinalmente, presa em superfície lisa de cartolina com alfinetes e fixada em formol tamponado 10 %, pH 7.4, por 24 horas. A seguir, foi corada pelo método histoquímico *SUDAN IV*, o qual, cora a gordura em vermelho, conforme descrição abaixo.

1. Cada amostra foi colocada dentro de uma “caixeta” de plástico (25x3 cm), em cujas paredes existem pequenos orifícios que permitem a passagem de líquidos por seu interior, mas não a sua saída do fragmento a ser processado.
2. A caixeta foi, então, imersa em água destilada, por cerca de três segundos.
3. Imediatamente, o material foi lavado com álcool etílico a 70°GL, também por cerca de três segundos.
4. A seguir, o material foi mergulhado em solução de *SUDAN IV* (preparado com 1g de solução de *SUDAN IV*, 50 ml de álcool a 70°GL e 50 ml de acetona), por cinco minutos.
5. Em seguida, o material foi embebido novamente em álcool a 70°GL, desta vez por um minuto.



6. Depois, os segmentos foram mergulhados em água destilada por cerca de três segundos.
7. Após, os fragmentos foram embebidas em hematoxilina de Harris, em um frasco com 50 ml.
8. A seguir, o material foi lavado em água comum por cerca de três segundos. O frasco continha 200 ml dessa água e, nesses três segundos, foram realizados movimentos helicoidais ascendentes.
9. Imediatamente, o material foi lavado em água destilada, até que todo o excesso de hematoxilina fosse retirado.

Após os procedimentos acima descritos, cada aorta foi retirada da caixeta e imersa em água destilada para posteriormente ser medida.

#### **3.2.4.2 Microscopia óptica**

Para a análise histológica, a artéria aorta aberta longitudinalmente, corada e fixada em formol tamponado, a 10 %, pH 7.4, foi representada nas porções torácica e abdominal através de dois cortes transversais de 0.5cm de espessura, 1cm após a emergência dos vasos da cossa da aorta e 1cm abaixo do diafragma, respectivamente. Esse material foi submetido a técnicas tradicionais de processamento para emblocamento em parafina. Os blocos de parafina foram submetidos a cortes seriados de 5 $\mu$ m para análise histológica através dos métodos de coloração hematoxilina–eosina (H&E) (Arruda *et al.*, 2003) e Tricrômico de Masson (Arruda *et al.*, 2003) e reações de imunohistoquímicas, para quantificação das variáveis indicadas a seguir.

### 3.2.4.3 Variáveis do estudo

- 1- Área da camada íntima;
- 2- Área da camada adventícia;
- 3- Perímetro da lâmina elástica externa (LEE);
- 5- Porcentagem de fibrose na placa;
- 6- Intensidade de infiltrado inflamatório na placa;
- 7- Intensidade de infiltrado inflamatório na camada adventícia;
- 8- Quantidade de *Mycoplasma pneumoniae* na camada íntima;
- 9- Quantidade de *Mycoplasma pneumoniae* na camada adventícia;
- 10- Quantidade de *Chlamydomphila pneumoniae* na camada íntima;
- 11- Quantidade de *Chlamydomphila pneumoniae* na camada adventícia
- 12- Quantificação macroscópica da gordura pelo método de coloração

*SUDAN IV*

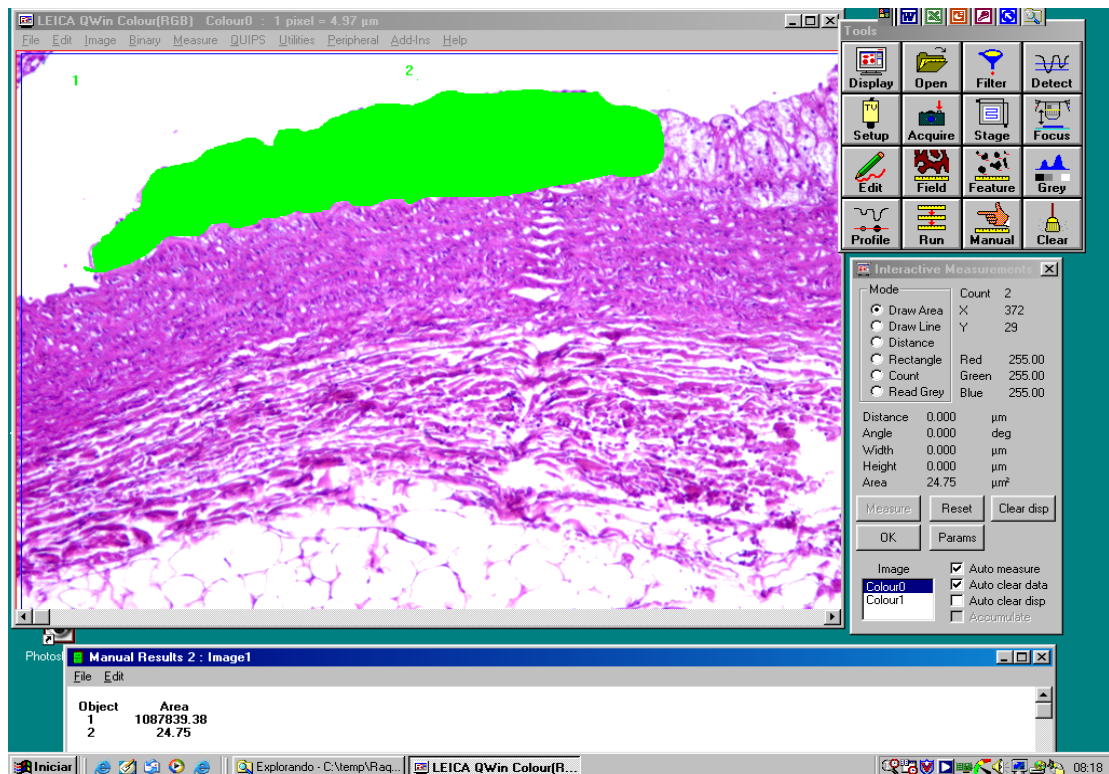
### 3.2.4.4 Análise das variáveis

As mensurações abaixo descritas foram realizadas por um programa computadorizado -Quantimet 500- acoplado a microscópio de luz Leica.

A área de gordura macroscópica da camada íntima, corada em vermelho pelo *SUDAN IV* foi avaliada por detecção de cor em porcentagem de área.

As áreas de microscopia foram delineadas manualmente, da seguinte forma: a lâmina elástica interna foi delineada, obtendo-se a área de luz em potencial. Continuando o contorno até a superfície endotelial, foi obtida a

área da íntima (**Figura 1**), enquanto a área da camada média foi obtida contornando-se a porção entre as lâminas elástica interna e externa.



**Figura 1** - Fotomicrografia de aorta de coelho representando delimitação manual da camada íntima para a medição da área ( $\mu\text{m}^2$ ) no analisador de imagens “Quantimet Leica”. (grupo B; aumento de 5x.)

A área da camada adventícia foi obtida também por delineamento manual abrangendo área colágena e área de tecido adiposo. Já o perímetro externo, foi obtido com a medida do comprimento da lâmina elástica externa.

A porcentagem de área de fibrose na placa foi determinada por detecção de cor, na lâmina corada pelo Tricrômico de Masson, o qual cora fibras colágenas em azul.

A porcentagem de área de gordura na placa foi obtida pelo cálculo da porção complementar da área de fibrose na placa.

A intensidade de infiltrado inflamatório foi avaliada por análise semiquantitativa em cruces (0 a 3). Esta análise foi feita com a observação de duas pessoas separadamente; estas discutiram as dúvidas surgidas, numa tentativa de solucioná-las. Para tal, foram utilizados os seguintes critérios:

<b>Intensidade</b>	<b>Celularidade</b>
0	Ausência
+	Um foco de acúmulo de mononucleares
+ +	Pequenos focos de acúmulo de mononucleares
+ + +	Infiltrado mononuclear difuso

#### **3.2.4.5 Imunohistoquímica**

Cortes histológicos seqüenciais da aorta (porções abdominal e torácica) foram submetidos a reações de imunohistoquímica.

##### ***Mycoplasma pneumoniae***

Após a desparafinação e bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio a 3% em PBS por 15 min, as lâminas foram submetidas à técnica de recuperação de antígenos, em microondas, por 10 minutos, utilizando-se tampão citrato, pH 6.0. As proteínas do tecido foram bloqueadas com protein block -serum-free (Dako, Capinteria, CA, Estados Unidos) por 2h a 37°C.

Em seguida as secções foram incubadas com anticorpo monoclonal produzido em camundongo para detecção de *Mycoplasma pneumoniae*, clone M2110181 (Fitzerald Concord MA, Estados Unidos), em uma diluição de 1:80 por 18h a 4°C.

O anticorpo secundário foi a anti-imunoglobulina de camundongo conjugado com a biotina (Dako Carpinteria, CA, Estados Unidos), diluída a 1:100, por 1h, a 37°C. Como composto de ligação para a biotina foi utilizada a estreptoavidina conjugada com a peroxidase (Amersham, Little Chalfont, Inglaterra), diluída a 1:50, por 1h, a 37°C. A visualização da reação antígeno/anticorpo foi feita com uma solução contendo 40 mg de 3,3'-diaminobenzidina (Sigma Chemical Corporation, St. Louis, MO, Estados Unidos) e 600µl de peróxido de hidrogênio a 6% diluídos em 100 ml de PBS, pH 7.4, resultando em coloração marrom e contra-coradas com hematoxilina de Harris. As lâminas foram então montadas em resina sintética Entellan (Merck, Darmstadt, Alemanha). (**Quadro 2**)

**Quadro 2** - Anticorpos utilizados e suas respectivas diluições e fornecedores

<b>Anticorpos</b>	<b>Diluição</b>	<b>Marca</b>
<i>Chlamydophila pneumoniae</i> clone RR-402	puro	Dako (Carpinteria, Ca, Estados Unidos)
<i>Mycoplasma.pneumoniae</i> Clone M2110181	1:80	Fitzgerald (Concord MA Estados Unidos)
Anti-imunoglobulina de camundongo	1:100	Dako (Carpinteria, Ca, Estados Unidos)

### ***Chlamydophila pneumoniae***

Os procedimentos iniciais foram idênticos aos já descritos no protocolo de imunohistoquímica para o *M. pneumoniae*. A seguir as secções foram incubadas com anticorpo monoclonal para detecção de *C. pneumoniae*, clone RR-402 (Dako, Carpinteria, Estados Unidos), a 4°C por 18 horas, sem diluição. O anticorpo secundário foi a anti-imunoglobulina de camundongo conjugado com a biotina, da Dako, diluído a 1:50, por 1h, a 37°C. Como composto de ligação para a biotina foi utilizada estreptoavidina conjugada com a peroxidase, (da Amersham diluída a 1:50, por 1h, a 37°C. O cromógeno utilizado para esta reação também foi o 3,3'-diaminobenzidina (Sigma Chemical Corporation, St. Louis MO, Estados Unidos preparado da mesma maneira já descrita anteriormente. A contra-coloração foi feita com hematoxilina de Harris e as lâminas montadas com Entellan. (**Quadro 2**)

#### **3.2.4.4 Análise dos agentes infecciosos**

Para a avaliação da presença de *Chlamydophila pneumoniae* e de *Mycoplasma pneumoniae*, as secções histológicas foram submetidas às reações de imunoperoxidase e, posteriormente, quantificadas pelo sistema de análise de imagens Quantimet 500 (Leica Benfheim, Alemanha), utilizando a objetiva de 20 vezes, sendo a calibração de 1 pixel igual 0,311µm.

As áreas ocupadas pelos agentes infecciosos são automaticamente detectadas pela intensidade da cor marrom dada pelo cromógeno específico. Os resultados obtidos são expressos em porcentagem de área ocupada

pelos agentes infecciosos e a área total das camadas íntima e adventícia em  $\mu\text{m}^2$ . Resultados esses depois convertidos em  $\text{mm}^2$ .

A espessura maior da camada íntima foi determinada em  $\mu\text{m}$ , medindo-se um segmento de reta da superfície endotelial até a lâmina elástica interna.

### **3.2.5 Metodologia Estatística**

A análise descritiva das variáveis foi feita através dos valores de média, mediana e desvio-padrão. A normalidade dos dados foi verificada através dos testes de Kolmogorov-Smirnov (Neter, 1996).

Para testar a hipótese de igualdade das variáveis entre os três grupos foi utilizado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis com comparações múltiplas pelo teste de Dunn ou pelo teste de Tukey (Rosner, 1986).

Cada grupo separadamente, foi então, comparado em relação às demais variáveis por meio dos testes t-pareado -teste paramétrico de médias que supõe distribuição normal para os dados- e do teste não-paramétrico de Mann-Whitney (Conover, 1999), que corresponde ao teste t, mas não supõe distribuição normal para os dados.

O teste de correlação de Spearman foi utilizado para verificar a existência e o grau de correlação entre variáveis analisadas.

A significância estatística adotada neste estudo para todos os testes foi de 5% ( $p=0,05$ ).

Para a análise, foi utilizado o sistema estatístico Sigma Stat, 1997.

## 4 *Resultados*

---

---



Cada aorta foi medida em seu comprimento e largura. Os valores médios e desvios padrão de cada grupo estão relatados no **Tabela 1**.

**Tabela 1** - Valores de média e desvio padrão de comprimento e largura das aortas dos três grupos, medidos em centímetros

		<b>Grupo A</b>	<b>Grupo B</b>	<b>Grupo C</b>
<b>Comprimento (Desvio padrão)</b>		19,05 (1,17)	19,97 (1,03)	17,55 (0,62)
<b>Largura (Desvio padrão)</b>	T	0,61 (0,08)	0,80 (0,06)	0,53 (0,06)
	A	0,43 (0,06)	0,54 (0,05)	0,45 (0,06)

T: segmento torácico

A: segmento abdominal

## 4.1 VARIÁVEIS ESTUDADAS

### 4.1.1 Visão geral dos resultados das variáveis

Na tabela abaixo estão dispostos as médias, desvios-padrão, teste de normalidade e “P” das variáveis, nos três grupos estudados de aorta de coelhos. Os resultados das análises das variáveis estão discriminados a seguir (**Tabela 2**).

Tabela 2 - Medidas descritivas das variáveis de interesse segundo cada grupo

variáveis	Grupo A				Grupo B				Grupo C						
	Média	dp	P	Norm	Média	dp	P	Norm	Média	dp	P	Norm			
Íntima <sup>(1)</sup>	T	0,002	0,000	0,141	sim	T	0,31	0,09	$\leq 0,001$	sim	T	0,60	0,16	$\leq 0,001$	sim
	A	0,002	0,000		não	A	0,03	0,01		sim	A	0,30	0,07		sim
L. Média <sup>(1)</sup>	T	87	8	0,926	sim	T	180	43	$\leq 0,001$	sim	T	255	71	$\leq 0,001$	sim
	A	89	73		sim	A	112	32		sim	A	148	27		sim
Adv <sup>(1)</sup>	T	663	71	0,822	sim	T	656	75	$\leq 0,001$	sim	T	265	80	0,754	sim
	A	652	139		sim	A	369	297		não	A	228	78		sim
Perímetro <sup>(4)</sup>	T	2,63	0,36	0,517	sim	T	2,46	0,38	0,127	não	T	2,23	0,50	0,084	sim
	A	2,51	0,36		sim	A	2,37	0,49		sim	A	2,07	0,44		sim
Infl Int <sup>(3)</sup>	T	0,54	0,52	0,016	não	T	1,15	0,80	0,028	não	T	2,15	0,69	0,027	não
	A	0	0		não	A	0,62	0,65		não	A	1,54	0,52		não
Infl Adv <sup>(3)</sup>	T	0,38	0,51	0,063	não	T	0,92	0,76	0,250	sim	T	1,77	0,73	0,250	não
	A	0	0		não	A	0,62	0,65		não	A	1	0,58		não
Fibrose <sup>(2)</sup>	T	s/ placa	s/ placa	s/ placa	não	T	10,55	4,87	$\leq 0,001$	sim	T	23,80	7,21	$\leq 0,001$	sim
	A	s/ placa	s/ placa	s/ placa	não	A	1,28	0,83		sim	A	11,11	4,91		não
Gordura <sup>(2)</sup>	T	s/ placa	s/ placa	s/ placa	não	T	89,45	4,87	$\leq 0,001$	sim	T	76,20	7,21	$\leq 0,001$	sim
	A	s/ placa	s/ placa	s/ placa	não	A	98,72	0,83		sim	A	88,89	4,91		não
Macro <sup>(5)</sup>	T	s/ placa	s/ placa	s/ placa	não	T	33,4	13,22	$\leq 0,001$	sim	T	73,74	47,42	$\leq 0,001$	sim
	A	s/ placa	s/ placa	s/ placa	não	A	23,2	10,32		sim	A	9,89	16,4		sim

continua

**Tabela 2 -** Medidas descritivas das variáveis de interesse segundo cada grupo. (continuação)

variáveis	Grupo A				Grupo B				Grupo C						
	Média	dp	P	Norm	Média	dp	P	Norm	Média	dp	P	Norm			
<b>MP Int<sup>(2)</sup></b>	T	0,013	0,008	<b>0,005</b>	não	T	4,81	0,26	<b>≤0,001</b>	não	T	25,6	0,40	<b>≤0,001</b>	sim
	A	0,05	0,04		não	A	1,83	0,05		não	A	19,1	0,50		sim
<b>MP Adv<sup>(2)</sup></b>	T	0,81	0,83	<b>≤0,001</b>	não	T	11,62	0,50	<b>≤0,001</b>	sim	T	23,27	0,67	<b>0,049</b>	sim
	A	0,12	0,03		não	A	1,43	0,07		sim	A	18,62	0,64		sim
<b>CP Int<sup>(2)</sup></b>	T	0,007	0,003	0,096	não	T	2,21	0,19	<b>0,017</b>	sim	T	23,52	0,54	<b>0,015</b>	sim
	A	0,02	0,02		não	A	1,16	0,05		sim	A	17,34	0,47		sim
<b>CP Adv<sup>(2)</sup></b>	T	0,55	0,27	<b>≤0,001</b>	não	T	10,45	0,53	<b>≤0,001</b>	sim	T	24,2	0,84	<b>0,015</b>	sim
	A	0,06	0,01		não	A	1,42	0,06		sim	A	18,4	0,35		não
<b>MP/CP Int<sup>(6)</sup></b>	T	2,59	1,08	<b>0,002</b>	não	T	2,85	2,88	<b>0,008</b>	sim	T	1,05	0,43	0,945	sim
	A	2,63	11,37		não	A	1,71	6,65		sim	A	1	0,4		sim
<b>MP/CP Adv<sup>(6)</sup></b>	T	1,09	1,04	0,164	sim	T	1,04	1,57	0,539	não	T	1	0,38	0,958	sim
	A	2,01	0,72		sim	A	1,18	0,76		não	A	1,02	0,35		sim

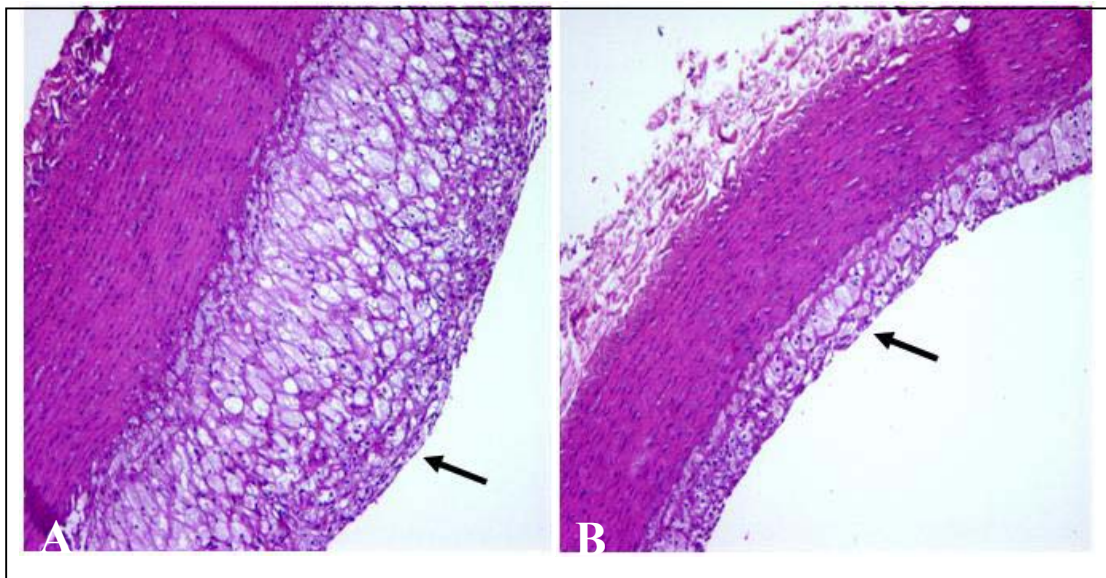
1: mm<sup>2</sup> ; 2: porcentagem de área (% de área positiva); 3: análise semi-quantitativa; 4: mm; 5: SUDAN IV 6: razão; T: segmento torácico; A: segmento abdominal; Adv: adventícia; Infl: inflamação; Int: camada íntima; dp = desvio padrão; norm = teste normalidade.

## 4.2 COMPARAÇÃO ENTRE OS SEGMENTOS TORÁCICO E ABDOMINAL

Na tabela acima, para as variáveis que apresentaram distribuição normal foi aplicado o teste paramétrico “t” pareado e quando a suposição de normalidade foi rejeitada aplicou-se o *Wilcoxon signed rank test*.

### 4.2.1 Análise da espessura das camadas íntima, média e adventícia

As camadas íntima ( $\text{mm}^2$ ) e média ( $\text{mm}^2$ ) apresentaram-se significativamente maiores na porção torácica do que na porção abdominal, tanto no grupo B quanto no grupo C ( $p \leq 0,001$ ) (**Figura 2**). Não houve diferença dessas variáveis no grupo A (controle).



**Figura 2** - Fotomicrografias de segmentos de aortas de coelho representando o grupo C, ilustrando os tamanhos de placas nas porções torácica e abdominal. (H&E, A: Porção torácica, B: Porção abdominal, aumento de 10x)

A área adventícia mostrou maior espessura no segmento torácico do que no segmento abdominal ( $p \leq 0,001$ ), somente no grupo B.

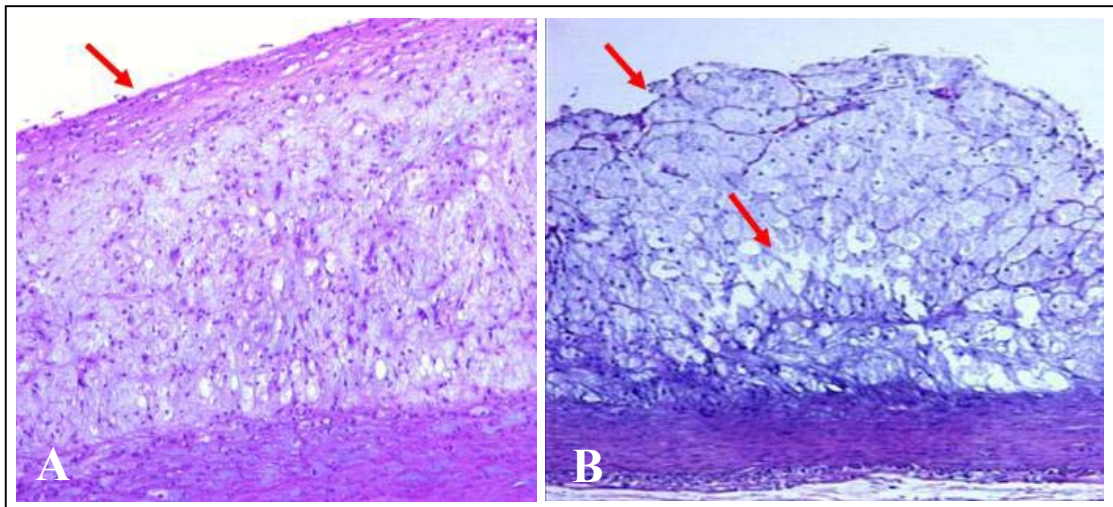
#### **4.2.2 Análise do perímetro, inflamação e quantidade de gordura na placa**

Não houve diferença significativa quanto ao perímetro entre o segmento torácico e abdominal dos três grupos.

Houve maior inflamação no segmento torácico do que no segmento abdominal dos três grupos.

A porcentagem de fibrose na placa foi maior no segmento torácico do que no segmento abdominal nos grupos B e C ( $p \leq 0,001$ ). Essa variável não foi quantificada no grupo A por não haver placas ateroscleróticas neste grupo. **(Figura 3)**

A porcentagem de área ocupada pela gordura na placa foi maior na porção abdominal do que na porção torácica ( $p \leq 0,001$ ). **(Figura 3)**



**Figura 3** - Fotomicrografias de segmentos de aortas de coelho representando o grupo C, ilustrando os tipos de placas nas porções torácica e abdominal (H&E, A: Porção torácica, B: Porção abdominal, aumento de 10x)

#### 4.2.3 Análise dos agentes infecciosos

A porcentagem de área de MP na camada íntima foi significativamente maior na porção abdominal do que na torácica no grupo A ( $p=0,005$ ). Ocorrendo o inverso nos grupos B ( $p \leq 0,001$ ) e C ( $p \leq 0,001$ ) onde os valores foram maiores na porção torácica.

Por outro lado, a porcentagem de área de MP na adventícia foi significativamente maior na porção torácica. Grupo A ( $p \leq 0,001$ ), grupo B ( $p \leq 0,001$ ), grupo C ( $p=0,049$ )

A porcentagem de área de CP na camada íntima no grupo A foi maior na porção abdominal, porém sem apresentar diferença estatística ( $p \leq 0,075$ ). Enquanto nos grupos B ( $p \leq 0,017$ ), e C ( $p \leq 0,015$ ), os valores maiores foram encontrados no segmento torácico.

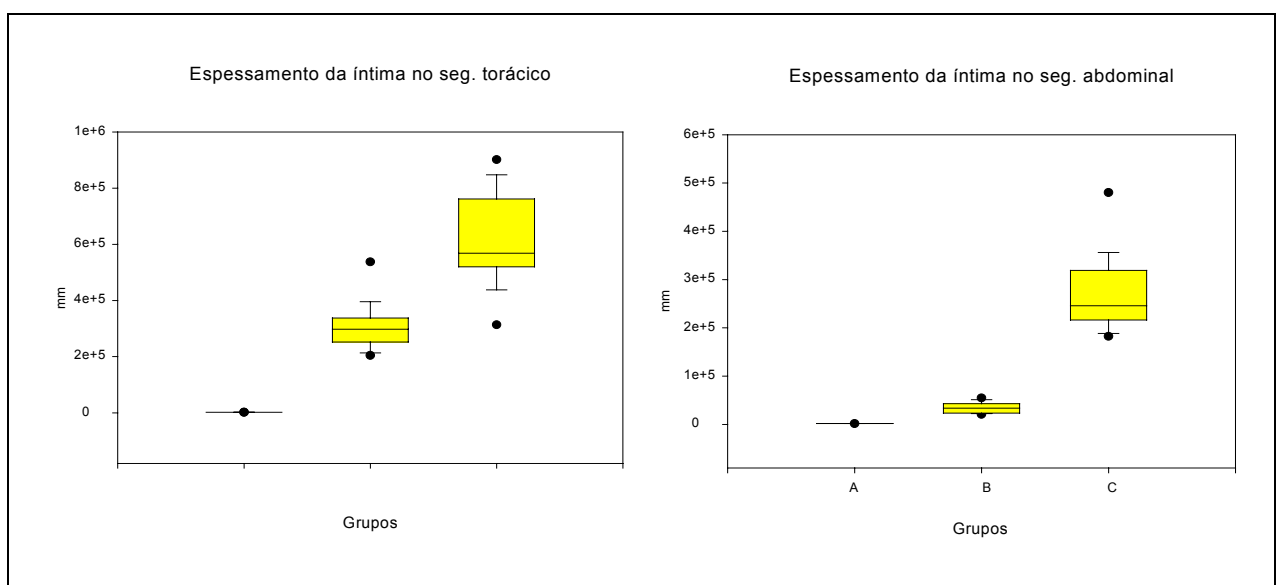
Na adventícia, a porcentagem de área de CP foi maior no segmento torácico do que no segmento abdominal nos três grupos.

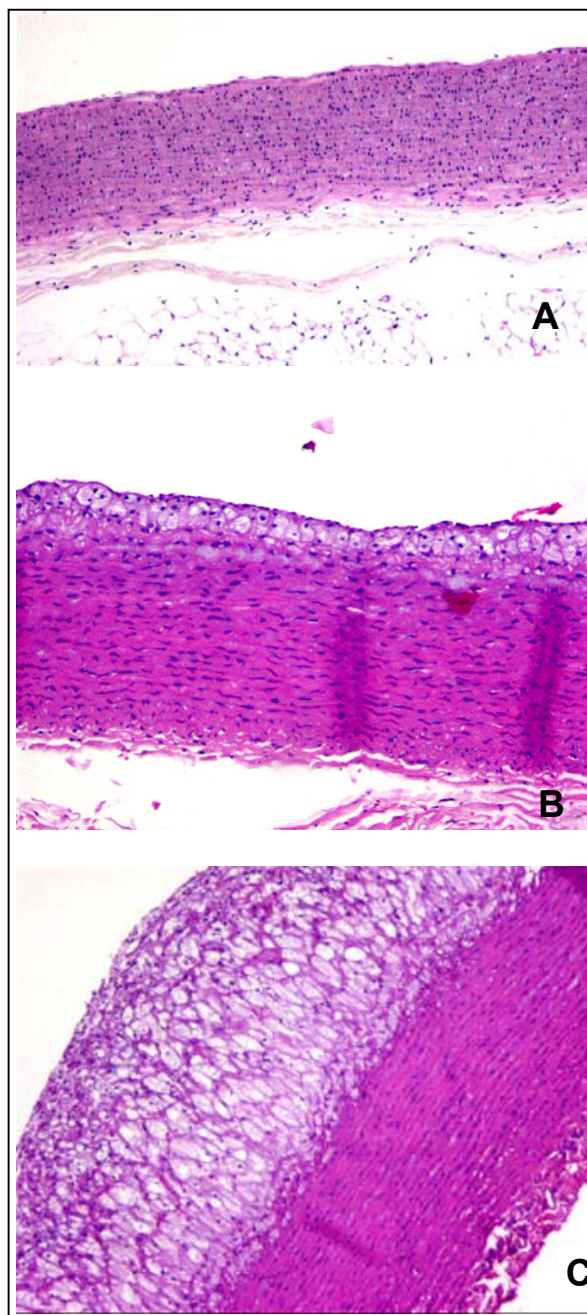
#### 4.3 COMPARAÇÃO DO ESPESSAMENTO INTIMAL NOS GRUPOS A, B e C NOS SEGMENTOS ESTUDADOS

No segmento torácico, a espessura intimal média do grupo A foi menor do que no grupo B; este, por sua vez, foi menor do que no grupo C ( $p \leq 0,001$ ). (**Figura 4**). Teste de Kruskal-Wallis e teste de Dunn para comparação entre os grupos (**Gráfico 1**).

O segmento abdominal reproduziu o mesmo comportamento que o torácico, porém com valores menores ( $p \leq 0,001$ ). (**Gráfico 1**).

**Gráfico 1** - Distribuição de valores de média e mediana da espessura da placa de aterosclerose nas porções torácica e abdominal segundo os diferentes grupos estudados



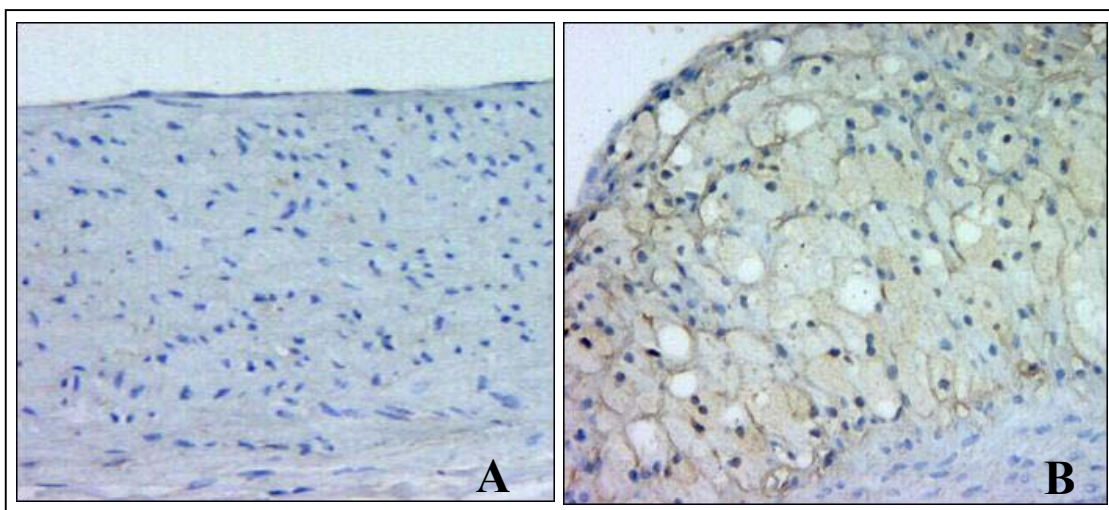


**Figura 4-** Fotomicrografias de aortas de coelhos ilustrando evolução do quadro de aterosclerose experimental no segmento torácico. (H&E, A:Grupo A B: Grupo B. C:Grupo C, aumento 10x)



#### 4.3.1 Análise da comparação dos agentes infecciosos entre si nos diferentes grupos nos segmentos estudados

Na íntima do segmento torácico, houve maior concentração de antígenos de MP no grupo C; o qual, por sua vez, foi maior do que no grupo B, que por sua vez, foi maior do que no grupo A (Teste Kruskal-Wallis e Teste de Dunn ( $p \leq 0,001$ )). (Figura 5)



**Figura 5** - Fotomicrografias de segmentos de aortas de coelhos coradas pela técnica de imunohistoquímica, para marcação de antígenos do *M. pneumoniae*, ilustrando uma forte marcação na camada íntima no grupo C ( em marrom) em contraste com uma leve marcação no grupo . (A:grupo A , B: grupo C, aumento 10x.)

Na adventícia desse segmento, foi observada o mesmo comportamento: onde o grupo C teve valores maiores do que B e A, porém não houve diferença significativa entre B e A (Teste de Tukey).

As médias do grupo C foram maiores do que as do grupo B, as quais, por sua vez, foram maiores do que as do grupo A, tanto na íntima quanto na adventícia ( $p \leq 0,001$ ).

No segmento abdominal também foi observada maior concentração de antígenos de MP no grupo C; esta foi maior que no grupo B, a qual, por sua vez, foi maior do que a do grupo A (Teste Kruskal-Wallis e Teste de Dunn,  $p \leq 0,001$ ).

Na adventícia, o grupo C assim como no segmento torácico teve valores maiores do que B e A, porém não houve diferença significativa entre B e A (Teste de Dunn).

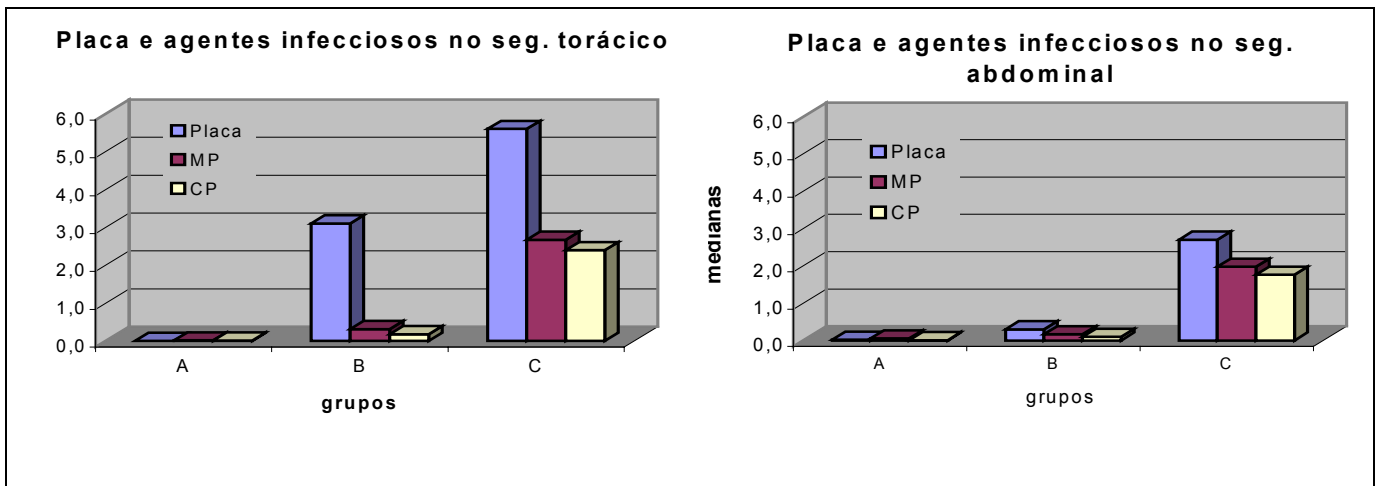
A porcentagem de área positiva para antígenos de CP na íntima mostrou as médias do grupo C maiores do que as do grupo B, as quais, por sua vez, foram maiores do que as do grupo A ( $p \leq 0,001$ ).

Na adventícia, a os valores do grupo C foram maiores do que os do grupo B que, por sua vez, no segmento abdominal, não apresentou diferença em relação ao grupo A (Teste de Dunn).

#### **4.3.2 Análise do espessamento intimal e sua relação com a presença dos agentes infecciosos nos segmentos estudados**

O Gráfico 2 demonstra o aumento proporcional observado entre a placa de aterosclerose *versus* agentes infecciosos, no segmento torácico.

**Gráfico 2** - Distribuição de valores de mediana em  $\text{mm}^2$  da espessura da placa de aterosclerose nas porções torácica e abdominal e distribuição da porcentagem de área positiva para MP e CP ( $\text{MP e CP} \times 10^{-1}$ ) segundo os diferentes grupos estudados



Analisando todos os grupos de coelhos conjuntamente, observamos correlações positivas entre as variáveis área intimal e quantidade de MP e de CP (**Tabela 3**).

Houve também, forte correlação desses microorganismos entre si tanto na camada íntima como na camada adventícia, nos segmentos torácico e abdominal.

A correlação entre adventícia *versus* agentes infecciosos foi negativa.

**Tabela 3** - Coeficientes de correlação (r) nos três grupos analisados nos segmentos torácico e abdominal das áreas das camadas íntima e adventícia da aorta, Variáveis correlacionadas: espessamento intimal vs agentes infecciosos (*M.pneumoniae* e *C.pneumoniae*); agentes infecciosos entre si; área da camada adventícia vs agentes infecciosos, considerando todos os animais (A+B+C)

<b>Variáveis Correlacionadas</b>	<b>Tórax r (P)</b>	<b>Abdome r (P)</b>
Íntima <i>versus</i> MP íntima	0,84(<0,001)	0,92(<0,001)
Íntima <i>versus</i> MP adventícia	0,77(<0,001)	0,68(<0,001)
Íntima <i>versus</i> CP íntima	0,85(<0,001)	0,84(<0,001)
Íntima <i>versus</i> CP adventícia	0,83(<0,001)	0,83(<0,001)
MP íntima <i>versus</i> CP íntima	0,90 (<0,001)	0,84 (<0,001)
MP adventícia <i>versus</i> CP adventícia	0,78 (<0,001)	0,73 (<0,001)
MP íntima <i>versus</i> CP adventícia	0,86 (<0,001)	0,83 (<0,001)
MP adventícia <i>versus</i> CP íntima	0,66 (<0,001)	0,68 (<0,001)
Adventícia <i>versus</i> MP íntima	-0,49(<0,001)	-0,60 (<0,001)
Adventícia <i>versus</i> MP adventícia	-0,47(<0,001)	-0,30 (<0,007)
Adventícia <i>versus</i> CP íntima	-0,48(<0,001)	-0,50 (<0,001)
Adventícia <i>versus</i> CP adventícia	-0,55(<0,001)	-0,45 (<0,001)

#### 4.3.3 Análise entre perímetro e espessamento intimal

O perímetro externo da aorta na porção torácica, no grupo A se mostrou maior do que B e maior do que C, não havendo diferença

significativa entre os grupos B e C ( $p=0,015$ ) Teste de Kruskal-Wallis.

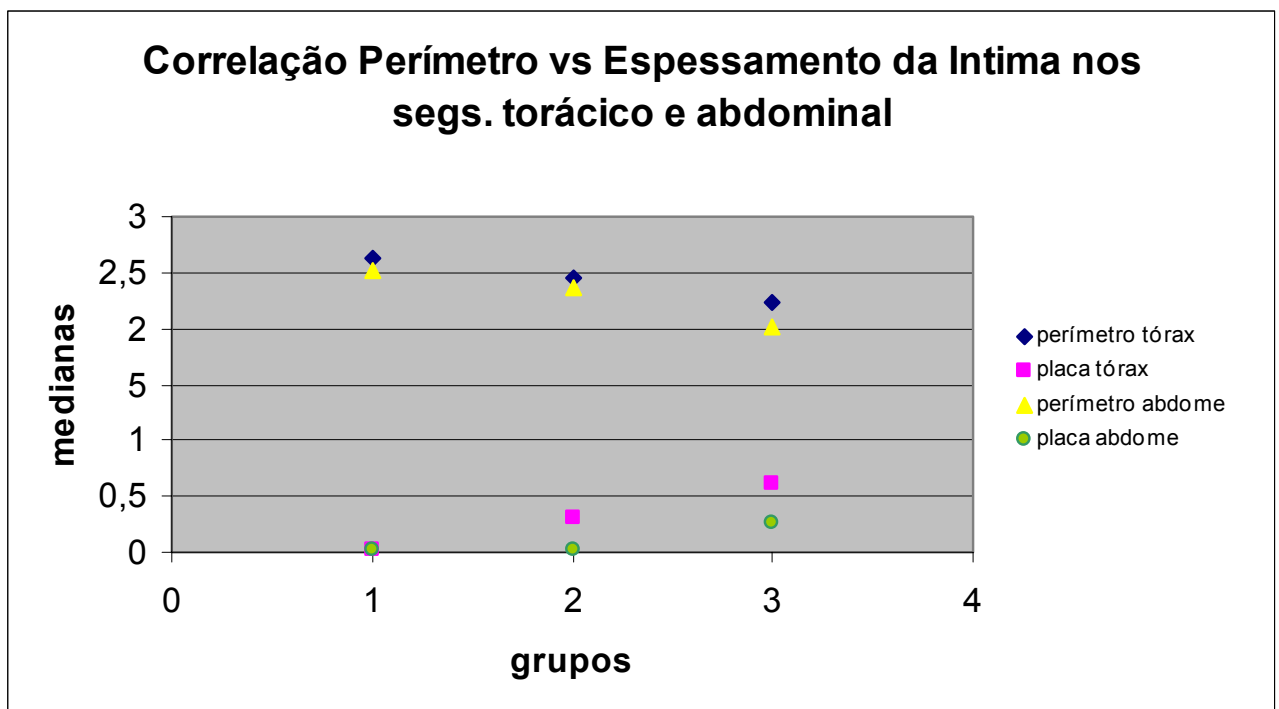
**(Tabela 2)**

No tórax, houve correlação negativa entre espessamento intimal e perímetro do vaso nos grupos B ( $p<0,001$ ;  $r=-0,4$ ) e C ( $p<0,001$ ;  $r=-0,4$ ). No grupo A não houve correlação ( $p<0,250$ ;  $r=0,3$ ). (**Gráfico3**)

No abdome, o teste Kruskal-Wallis detectou uma diferença significativa ( $p<0,001$ ): O grupo A se mostrou maior do que C; não houve, diferença significativa entre os grupos B e C e B e A (Teste de Tukey).

Também não houve correlação entre perímetro do vaso e espessamento intimal nesse segmento.

**Gráfico 3** - Distribuição de valores de mediana em  $\text{mm}^2$  da espessura da placa de aterosclerose nas porções torácica e abdominal e distribuição de mediana em mm do perímetro da aorta nos segmentos torácico e abdominal



#### 4.3.4 Análise da inflamação nos dois segmentos

Os resultados referentes a semiquantificação do infiltrado inflamatório encontram-se na **Tabela 2**.

A inflamação na placa de aterosclerose do segmento torácico da aorta mostrou o grupo C maior do que o grupo A e o grupo C maior que o grupo B, não havendo diferença estatística entre os grupos A e B (**Gráfico 4**).

O envolvimento da camada adventícia por células inflamatórias seguiu o mesmo padrão de acometimento na placa. Os três grupos diferem entre si de maneira significativa, não havendo diferença significativa entre o grupo A e B (**Gráfico 4**).

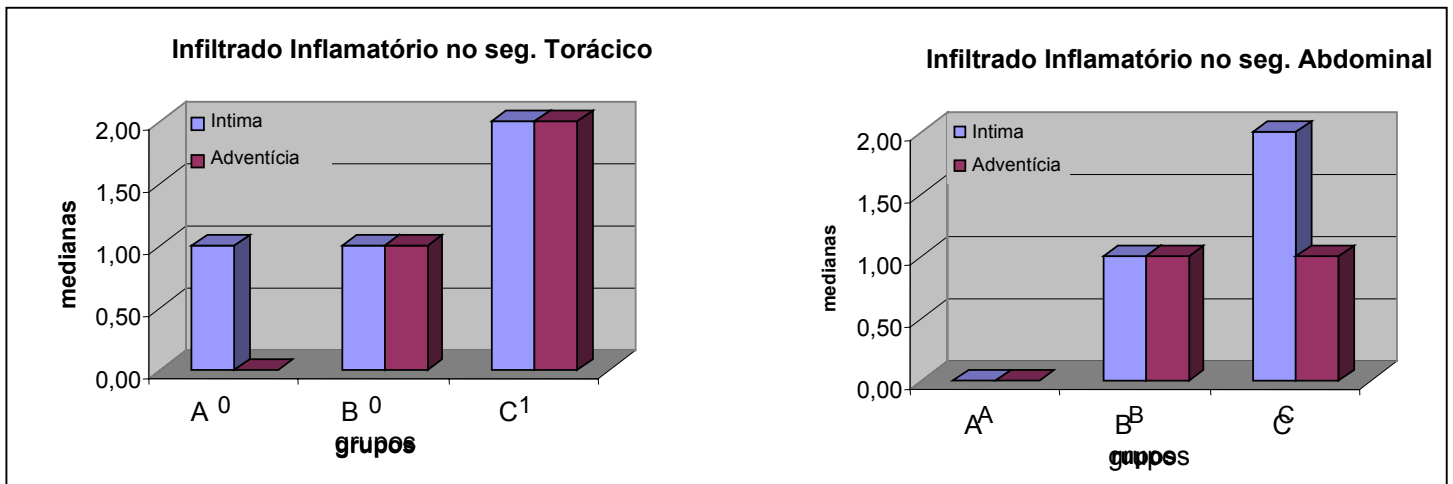
Analisando todos os grupos de coelhos conjuntamente, houve correlação positiva entre infiltrado inflamatório e espessamento da camada íntima. ( $p \leq 0,001$ ;  $r=0,6$ ), assim como com a adventícia ( $p \leq 0,001$ ;  $r=0,6$ ).

A inflamação na placa de aterosclerose do segmento abdominal da aorta também mostrou C maior que A e C maior que B, não havendo diferença estatística entre os grupos A e B (**Gráfico 4**).

Na adventícia houve diferença significativa entre os grupos ( $p \leq 0,001$ ), mas não entre os grupos A e B e C e B (**Gráfico 4**).

Ainda em relação ao segmento abdominal, houve correlação positiva entre infiltrado inflamatório e espessamento da camada íntima ( $p \leq 0,001$ ;  $r=0,82$ ) e correlação negativa com a adventícia ( $p \leq 0,001$ ;  $r= -0,50$ ).

**Gráfico 4** - Distribuição de valores de mediana da freqüência do grau inflamatório nas camadas íntima e adventícia das porções torácica e abdominal segundo os diferentes grupos estudados



#### 4.3.4.1 Análise semiquantitativa do infiltrado inflamatório e sua relação com a presença dos agentes infecciosos nos dois segmentos

Correlações positivas foram obtidas entre o infiltrado inflamatório e a porcentagem de área positiva para antígenos de MP e CP (**Tabela 4**).

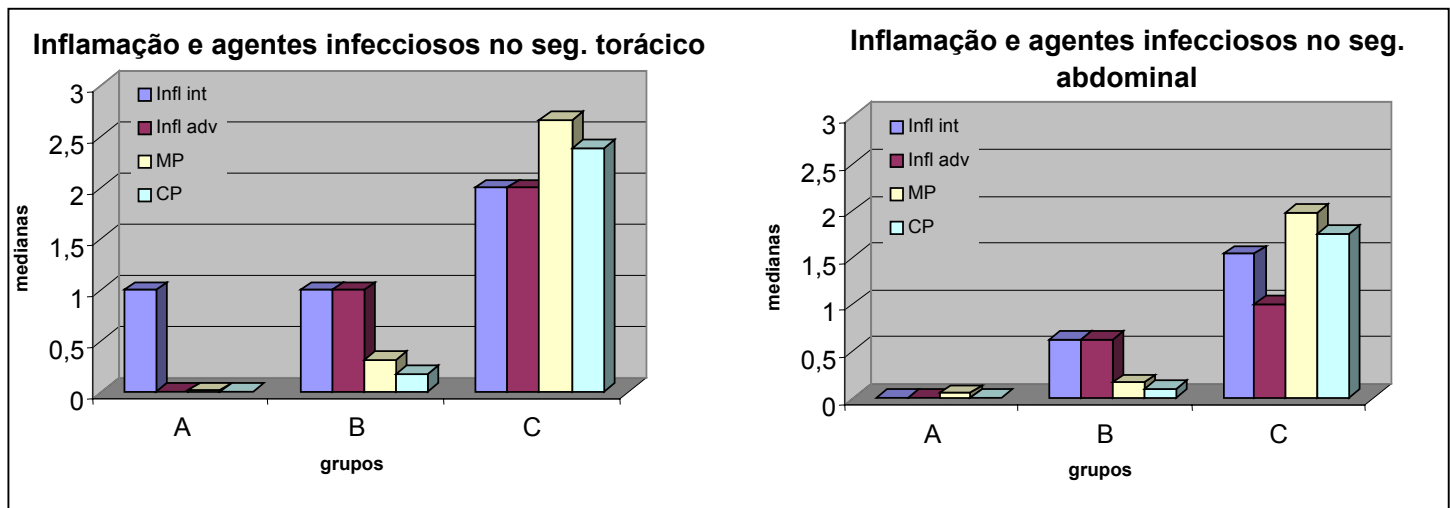
**Tabela 4 -** Coeficientes de correlação (r) nos três grupos analisados nos segmentos torácico e abdominal nas camadas íntima e adventícia da aorta. Variáveis correlacionadas: Inflamação vs espessamento intimal; inflamação vs agentes infecciosos, considerando todos os animais (A+B+C)

<b>Variáveis Correlacionadas</b>	<b>Tórax r (P)</b>	<b>Abdome r (P)</b>
Infl íntima <i>versus</i> espessamento íntima	0,60(<0,001)	0,82(<0,001)
Infl íntima <i>versus</i> MP íntima	0,68(<0,001)	0,65(<0,001)
Infl íntima <i>versus</i> CP íntima	0,70(<0,001)	0,65(<0,001)
Infl íntima <i>versus</i> MP adventícia	0,52(<0,001)	0,63(<0,001)
Infl íntima <i>versus</i> CP adventícia	0,57(<0,001)	0,74(<0,001)
Infl adv <i>versus</i> espessamento íntima	0,60 (<0,001)	-0,50 (<0,001)
Infl adventícia <i>versus</i> MP adventícia	0,55 (<0,001)	0,58 (<0,001)
Infl adventícia <i>versus</i> CP adventícia	0,68 (<0,001)	0,64 (<0,001)
Infl adventícia <i>versus</i> MP íntima	0,70 (<0,001)	0,56 (<0,001)
Infl adventícia <i>versus</i> CP íntima	0,68 (<0,001)	0,66 (<0,001)

O **Gráfico 5** demonstra o aumento proporcional que ocorre entre a intensidade de infiltrado inflamatório vs agentes infecciosos.



**Gráfico 5** - Distribuição de valores de mediana da freqüência do grau inflamatório nas camadas íntima e adventícia das porções torácica e abdominal e distribuição da porcentagem de área de MP e CP (MP e CP x 10<sup>-1</sup>) segundo os diferentes grupos estudados



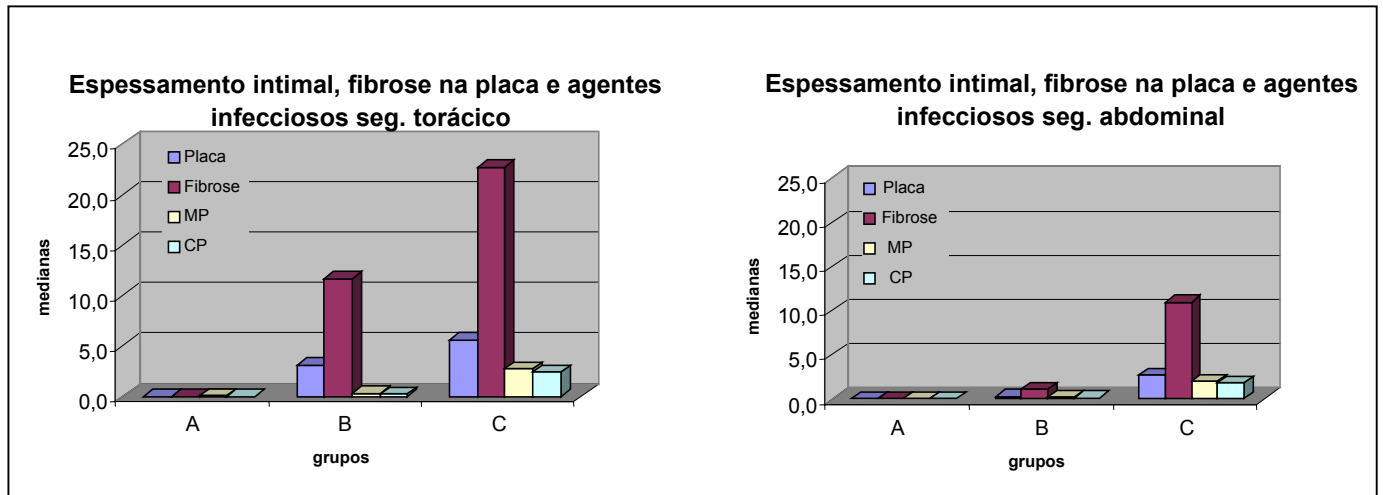
#### 4.3.5 Análise da fibrose

A porcentagem de área de fibrose na placa no segmento torácico foi maior no grupo C do que no grupo B ( $p \leq 0,001$ ) (**Gráfico 6**).

A porcentagem de área de fibrose na placa no segmento abdominal, assim como no segmento torácico, foi maior no grupo C do que no grupo B ( $p \leq 0,001$ ) (**Gráfico 6**).

Na porcentagem área de gordura no segmento abdominal, os valores do grupo B são maiores do que os do grupo C ( $p \leq 0,001$ ). Nesse segmento, porém, os valores foram maiores do que no segmento torácico.

**Gráfico 6** - Distribuição de valores de mediana do espessamento intimal, porcentagem de área de fibrose na placa de aterosclerose e porcentagem de área positiva para MP e CP ( $MP$  e  $CP \times 10^{-1}$ ) nas porções torácica e abdominal, segundo os diferentes grupos estudados

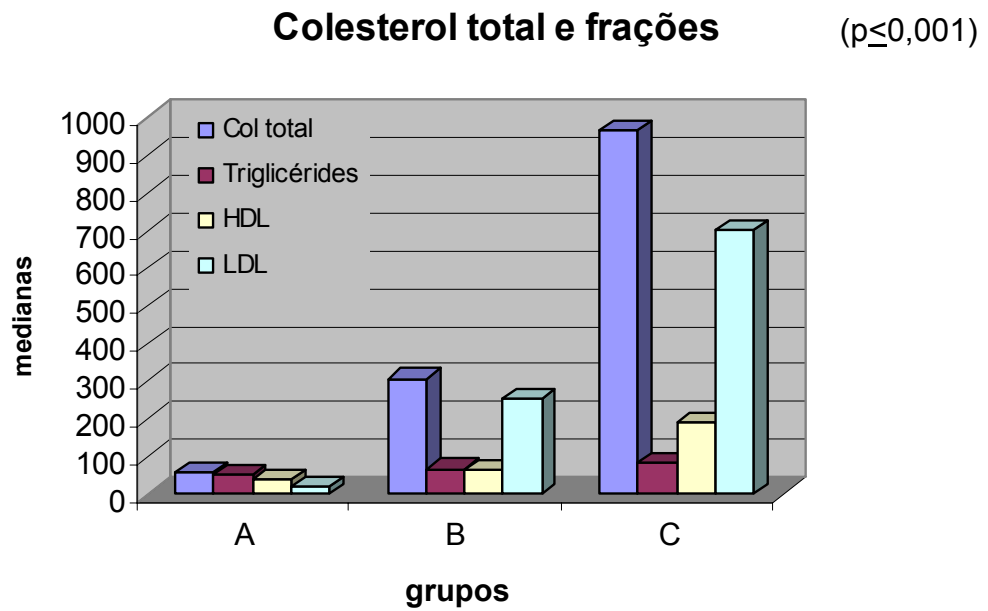


#### 4.3.6 Análise do colesterol total e frações

Os níveis séricos de colesterol, triglicérides, HDL e LDL submetidos separadamente aos testes Kruskal-Wallis e Dunn apresentaram diferença significativa entre os grupos ( $p \leq 0,001$ ) (**Gráfico 7**).

Observou-se também alta correlação positiva entre as variáveis e espessamento de placa de aterosclerose e agentes infecciosos (**Tabela 5**).

**Gráfico 7 -** Distribuição de valores de mediana das dosagens dos níveis séricos de colesterol total, triglicérides, HDL e LDL segundo os diferentes grupos estudados

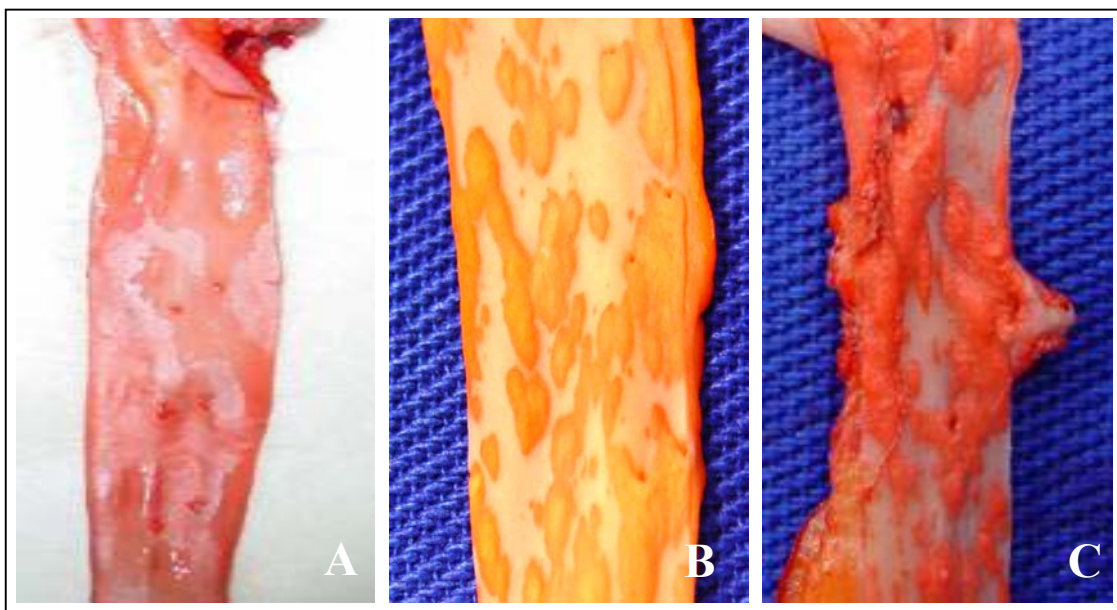


**Tabela 5 -** Coeficientes de correlação (r) nos três grupos analisados conjuntamente no segmento torácico nas camadas íntima e adventícia da aorta. Variáveis correlacionadas: a) Colesterol total vs espessamento intimal; Colesterol total vs agentes infecciosos; b) Triglicérides vs espessamento intimal, Triglicérides vs agentes infecciosos; c) HDL vs espessamento intimal, HDL vs agentes infecciosos, d) LDL vs agentes infecciosos nos segmentos torácico e abdominal, considerando todos os animais (A+B+C)

<b>Variáveis Correlacionadas</b>	<b>Tórax r (P)</b>	<b>Abdome r (P)</b>
Col total <i>versus</i> espessamento íntima	0,84(<0,001)	0,88(<0,001)
Col total <i>versus</i> MP íntima	0,92(<0,001)	0,89(<0,001)
Col total <i>versus</i> CP íntima	0,94(<0,001)	0,91(<0,001)
Col total <i>versus</i> MP adventícia	0,67 (<0,001)	0,70 (<0,001)
Col total <i>versus</i> CP adventícia	0,77 (<0,001)	0,89 (<0,001)
Trig <i>versus</i> espessamento íntima	0,59 (<0,001)	0,65 (<0,001)
Trig <i>versus</i> MP íntima	0,58 (<0,001)	0,58 (<0,001)
Trig <i>versus</i> CP íntima	0,53 (<0,001)	0,56 (<0,001)
Trig <i>versus</i> MP adventícia	0,50 (<0,001)	0,60 (<0,001)
Trig <i>versus</i> CP adventícia	0,59 (<0,001)	0,49 (<0,001)
HDL <i>versus</i> espessamento íntima	0,74 (<0,001)	0,78 (<0,001)
HDL <i>versus</i> MP íntima	0,78 (<0,001)	0,74 (<0,001)
HDL <i>versus</i> CP íntima	0,85 (<0,001)	0,78 (<0,001)
HDL <i>versus</i> MP adventícia	0,60 (<0,001)	0,63 (<0,001)
HDL <i>versus</i> CP adventícia	0,74 (<0,001)	0,68 (<0,001)
LDL <i>versus</i> espessamento íntima	0,85 (<0,001)	0,87 (<0,001)
LDL <i>versus</i> MP íntima	0,92 (<0,001)	0,85 (<0,001)
LDL <i>versus</i> CP íntima	0,91 (<0,001)	0,90 (<0,001)
LDL <i>versus</i> MP adventícia	0,66 (<0,001)	0,70 (<0,001)
LDL <i>versus</i> CP adventícia	0,76 (<0,001)	0,87 (<0,001)

#### 4.4 COMPARAÇÃO DA QUANTIFICAÇÃO MACROSCÓPICA DA GORDURA PELO MÉTODO DE COLORAÇÃO SUDAN IV NA SUPERFÍCIE INTIMAL DA AORTA DOS GRUPOS A, B e C

No segmento torácico, os valores de porcentagem de área macroscópica de gordura do grupo A, foi menor do que no grupo B, o qual, por sua vez, foi menor do que no grupo C ( $p \leq 0,001$ ). Testes Kruskal-Wallis e Teste de Tuckey para comparação entre os grupos (**Gráfico 8**). (**Figura 6**)

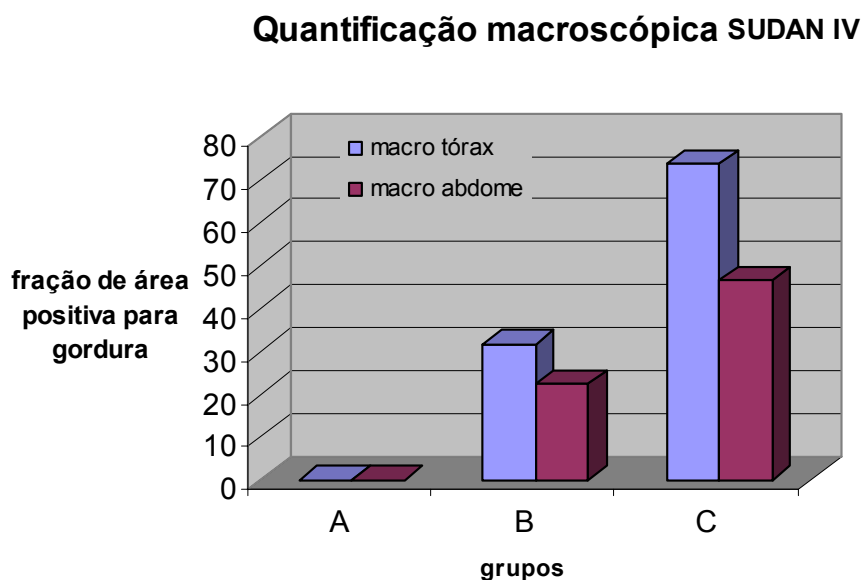


**Figura 6** - Aortas de coelho mostrando a área de gordura macroscópica da camada íntima (segmento torácico) avaliada por detecção de cor pelo método histoquímico *SUDAN IV*. (A: grupo A, B: grupo B, C grupo C, aumento 10x)

O segmento abdominal reproduziu o mesmo comportamento que o segmento torácico, com valores mais discretos, onde média do valor de

macroscopia no grupo C foi maior do que no grupo B, o qual, por sua vez, foi maior do que no grupo A ( $p \leq 0,001$ ). Testes Kruskal-Wallis e Teste de Dunn para comparação entre os grupos (**Gráfico 8**).

**Gráfico 8** - Distribuição de valores de porcentagem de área de quantificação macroscópica de gordura corada pelo método *SUDAN IV* nas porções torácica e abdominal segundo os diferentes grupos estudados



#### 4.4.1 Comparação da quantificação macroscópica da gordura pelo método de coloração *Sudan IV* entre os segmentos torácico e abdominal

Os valores da variável gordura macroscópica expressa em porcentagem de área positiva apresentaram-se significativamente maiores na porção torácica, tanto no grupo B quanto no grupo C ( $p \leq 0,001$ ), ocorrendo uma diferença significativa entre as variáveis nos segmentos analisados.

O grupo A apresentou valores próximos de zero.

Analisando todos os grupos de coelhos conjuntamente, observou-se correlações positivas entre as variáveis macroscopia e quantidade de MP e de CP, inflamação, fibrose, Colesterol total e frações (**Tabela 6**).

**Tabela 6** - Coeficientes de correlação (r) entre a porcentagem de área de gordura na superfície íntima *versus* as diferentes variáveis analisadas microscopicamente nos segmentos torácico e abdominal, considerando todos os animais (A+B+C)

<b>Variáveis Correlacionadas</b>	<b>Tórax r (P)</b>	<b>Abdome r (P)</b>
Macro <i>versus</i> espessamento íntima	0,89(<0,001)	0,92(<0,001)
Macro <i>versus</i> MP íntima	0,90(<0,001)	0,87(<0,001)
Macro <i>versus</i> MP adventícia	0,85(<0,001)	0,76(<0,001)
Macro <i>versus</i> CP íntima	0,90(<0,001)	0,88(<0,001)
Macro <i>versus</i> inflamação íntima	0,73 (<0,001)	0,84 (<0,001)
Macro <i>versus</i> inflamação adv	0,67 (<0,001)	0,65 (<0,001)
Macro <i>versus</i> fibrose placa	0,58 (<0,001)	0,70 (<0,001)
Macro <i>versus</i> col total	0,92 (<0,001)	0,89(<0,001)
Macro <i>versus</i> HDL	0,78(<0,001)	0,67 (<0,001)
Macro <i>versus</i> LDL	0,68(<0,001)	0,63 (<0,007)
Macro <i>versus</i> triglicérides	0,58(<0,001)	0,67 (<0,001)

#### 4.5 ANÁLISE DA RAZÃO ENTRE QUANTIDADE DE ANTÍGENOS DO *MYCOPLASMA PNEUMONIAE* VERSUS DE *CHLAMYDOPHILA PNEUMONIAE* (MP/CP) NOS GRUPOS A, B e C

Os valores da razão MP/CP na íntima dos grupos A e B foram significativamente maiores do que os do grupo C ( $p < 0,01$ ). **(Tabela 2)**

Na adventícia não houve diferença entre os 3 grupos ( $p = 0,51$ ). **(Tabela 2)**

No segmento de aorta abdominal, analisando a íntima, houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo A e o grupo C ( $p = 0,04$ ), mas não entre A e B ou entre B e C. **(Tabela 2)**

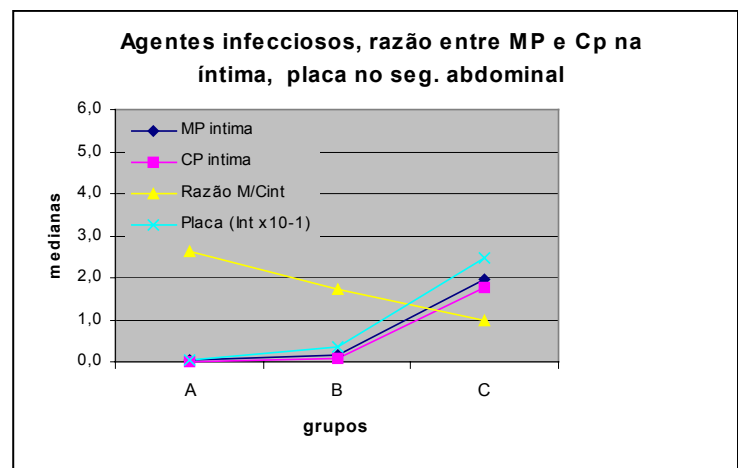
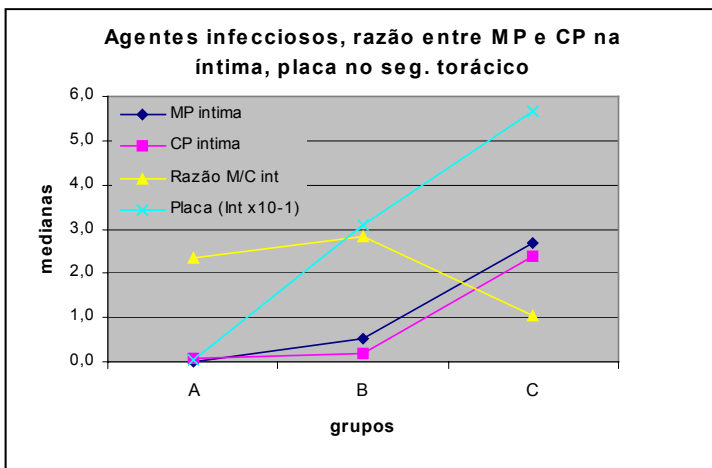
Na adventícia desse segmento, também houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos A e C e A e B, porém sem diferença entre B e C. ( $p < 0,01$ ). **(Tabela 2)**

O gráfico 9 mostra a mediana das porcentagens de área da íntima positivas para MP ou CP, a razão MP/CP nos 3 grupos, bem como o espessamento intimal dos mesmos. Como já relatado anteriormente, houve uma correlação positiva entre quantidade de agentes infecciosos e espessamento intimal. Vale ressaltar que o espessamento intimal no segmento torácico ocorre mais precocemente (**gráfico 9**) e isto parece se acompanhar de um aumento inicial maior dos agentes infecciosos na adventícia (**gráfico 10**). Na adventícia, a relação MP/CP é próxima de 1 desde o grupo controle.

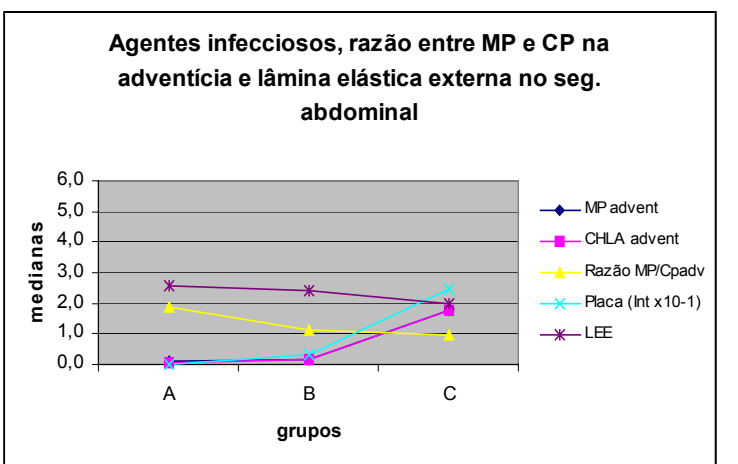
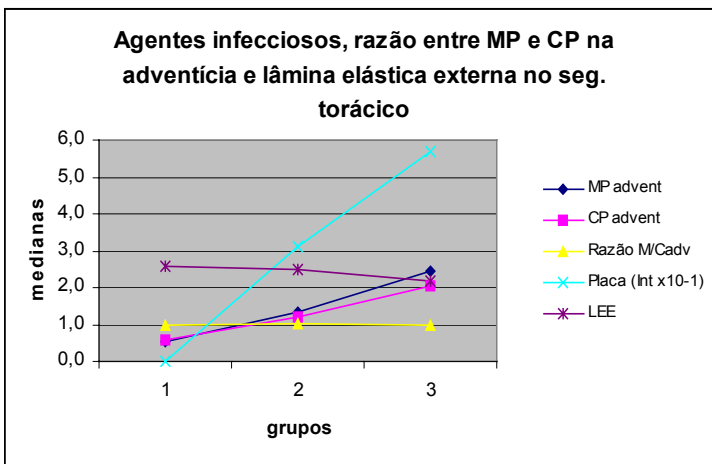


Ao gráfico 10 foi acrescentada a medida da lâmina elástica externa caracterizando o perímetro do vaso.

**Gráfico 9 -** Distribuição de valores da análise da razão da quantidade de antígenos de *M. pneumoniae* versus de *C. pneumoniae* (MP/CP) e placa de aterosclerose nos segmentos torácico e abdominal, segundo os diferentes grupos estudados



**Gráfico 10 -** Distribuição de valores da análise da razão da quantidade de antígenos de *M. pneumoniae* versus de *C. pneumoniae* (MP/CP), lâmina elástica externa e placa de aterosclerose nos segmentos torácico e abdominal, segundo os diferentes grupos estudados



## 5 *Discussão*

---

---

## 5.1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Fatores clássicos de risco habitualmente associados ao desenvolvimento da aterosclerose nem sempre conseguem explicar uma variabilidade da evolução da doença que existe entre um indivíduo e outro.

Hoje, o conceito de que a inflamação exerce um papel crucial na patogenia da aterosclerose (Anderson, 1998; Ross 1999; Libby, 2000; Aikawa, Libby, 2004) é um consenso. O que causa essa inflamação é a questão que permanece.

A infecção por agentes infecciosos, principalmente a *C. pneumoniae* tem sido progressivamente aventada como possível fator colaborador no processo de aterogênese. Nessa linha de raciocínio, agentes infecciosos exerceriam efeitos através da indução de resposta inflamatória local ou sistêmica ou ainda um processo autoimune (Ericson, 2000; Grayston, 2000). Ou seja, o risco de se desenvolver maior ou menor aterosclerose estaria relacionado com a quantidade de patógenos a que o indivíduo é exposto, havendo alta chance de que vários patógenos possam estar relacionados (Zhu *et al.*, 2000). Um dos mecanismos de ação seria que patógenos possam exercer efeitos lesivos diretos na parede do vaso, induzindo à formação de células xantomatosas por macrófagos e/ou efeitos indiretos

conseqüentes a uma resposta imune exacerbada (Kalayoglu, 1998; Ross, 1999).

Higuchi *et al.* (2000a; 2000b; 2003), Ericson *et al.* (2000) e de Vink *et al.* (2001) demonstraram agentes infecciosos nas placas, analisando lesões graves em pacientes humanos. No entanto, esses estudos não conseguiram afastar a possibilidade de que o ambiente da placa, rico em colesterol e outros ingredientes, seja apropriado para colonização secundária de agentes infecciosos. Ou seja, os agentes infecciosos seriam habitantes passivos da placa e não indutores de aterogênese. Assim é de fundamental importância verificar se os agentes infecciosos estão presentes na origem do desenvolvimento da placa aterosclerótica e para isso o ideal é a utilização de um modelo experimental que reproduza com bastante semelhança a doença humana.

É sabido que os coelhos não apresentam aterosclerose espontânea e são altamente responsivos à intervenção com alimentação rica em colesterol. Desta forma, vêm sendo utilizados para o entendimento dos eventos seqüenciais, desde a formação até a fase complicada da aterosclerose (Jawien, 2004).

Estudos com animais também demonstraram o papel patofisiológico da infecção por *C. pneumoniae* e o desenvolvimento de lesões ateroscleróticas em coelhos infectados com esse agente (Fong *et al.*, 1997), reforçando a hipótese de um papel ativo na doença.

## 5.2 NOSSOS ACHADOS

O nosso estudo teve como objetivo fundamental verificar se os agentes infecciosos *M. pneumoniae* e *C. pneumoniae* são habitantes comuns, não patogênicos da parede da artéria aorta nos segmentos torácico e abdominal dos coelhos e proliferam na presença de colesterol, conjuntamente com o desenvolvimento de inflamação da parede do vaso e formação da placa aterosclerótica. Caso isto seja comprovado, consistirá em um forte argumento adicional a favor de um papel patogênico desses agentes na patogenia da aterosclerose.

### 5.2.1 Quantidade de agentes infecciosos versus intensidade de espessamento intimal

O presente trabalho demonstrou a presença de pequena quantidade de antígenos da *C. pneumoniae* e *M. pneumoniae* na aorta de todos os animais controles, e em maior quantidade nos animais alimentados com dieta rica em colesterol.

Esses dados coincidem com estudos realizados em humanos demonstrando alta prevalência de anticorpos contra *C. pneumoniae* em adultos de diferentes países (Belland, 2004). Títulos elevados desses anticorpos não são comuns em indivíduos com menos de 5 anos de idade, mas na idade de 20 anos a soropositividade fica acima de 50% (Grayston,

2000), não havendo restrição geográfica e as reinfecções ocorrem com certa frequência.

No presente estudo encontramos de 100% de prevalência da infecção por pequena quantidade de *M. pneumoniae* e *C. pneumoniae* na parede da aorta dos animais do grupo controle, isentos placas ateroscleróticas. Com esse achado, a hipótese de que esses agentes poderão, na presença de colesterol proliferar e favorecer o surgimento de placas de ateroma torna-se viável.

Por outro lado, não houve maior quantidade de antígenos do *M. pneumoniae* ou da *C. pneumoniae* na íntima da aorta torácica do que na porção abdominal que justificasse a maior intensidade de aterosclerose naquela região. Dois fatores adicionais devem ser lembrados: 1) *Shear stress* ou força de cisalhamento maior na região pós crossa da aorta, definido como uma força tangencial sobre a superfície endotelial produzida pela fricção do fluxo sanguíneo, é reconhecido como de grande importância nos eventos hemodinâmicos (Dobrin, 1995; Chien, 1998; Jiang, 2000; Dobrin, 2001), vindo a contribuir com a gênese e com a progressão da aterosclerose (Jones, 1990; Fatourae, 1998; Jiang, 2000; Paszkowiak, 2003). Na região pós crossa da aorta, há um fluxo não laminar. Esse fluxo promove mudanças na estrutura do endotélio (Chien, 1998; Stéphanie, 1998; Jiang, 2000), migração de células musculares lisas (Dardik, 2005), aumento das moléculas de adesão e estado inflamatório da parede vascular. (Bharadva,j 1982; Kim, 1989; McIntyre, 1992; Cunningham, 2005). Nesse contexto, a região da aorta torácica estudada por nós estaria submetida a

um *shear stress* aumentado, o que também favoreceria a adesão de agentes infecciosos e sua penetração no interior da placa. 2) a pressão vascular no início da aorta descendente deve ser maior do que na porção abdominal, o que também, caracteriza um fator aterogênico em íntima relação ao desenvolvimento de *shear stress* (Zarins, Glagov, 1988, Fatourae, 1998).

Por outro lado, observamos na adventícia, resultados diferentes em relação à intensidade de infecção. Ou seja, encontramos maior quantidade de *M.pneumoniae* e de *C.pneumoniae* na adventícia da aorta torácica do que na aorta abdominal. Esses achados coincidem com os estudos de Vink *et al*, 2001, que por método de imunohistoquímica encontraram uma quantidade estatisticamente significativa de *C. pneumoniae* na adventícia em relação à placa, sugerindo que o vasa vasorum na adventícia possa ser uma via de passagem de monócitos infectados com agentes infecciosos para as lesões ateroscleróticas. Vários trabalhos têm mostrado que a adventícia tem papel fundamental na aterogênese (Vink 2001; Pasterkamp 2003, Moos, 2005).

Moreno e Fuster, 2004, afirmam que a formação da placa depende de uma neovascularização vinda da adventícia estendendo-se para a base da placa. A origem da neovascularização aterosclerótica foi elucidada por Kumamoto e colaboradores, que estabeleceram uma comunicação da neovascularização com o vasa vasorum da adventícia em 97% dos microvasos da placa (Kumamoto *et al.*, 1993).

Esses mesmos autores (Moreno, Fuster, 2002), observaram ausência de infiltrado inflamatório em placas ateromatosas recentes; por outro lado

encontraram, por caracterização histológica, de 22% a 69% de inflamação em placas ateromatosas avançadas e em 79% de placas rotas.

Trabalhos prévios realizados no InCor mostraram correlação positiva, entre intensidade de inflamação e quantidade de células infectadas por *C. pneumoniae* na adventícia de segmentos coronarianos com placa rota e que, a inflamação na adventícia é maior do que na íntima (Higuchi, 2003). Assim, a presença de maior quantidade de agentes infecciosos na adventícia da região torácica poderia contribuir para explicação da maior intensidade de aterosclerose nessa região.

A maior parte dos investigadores sobre a presença de *C. pneumoniae* na aterosclerose têm como foco principal a placa de ateroma, sendo a adventícia pouco explorada. Em artérias ateroscleróticas, a localização de monócitos/macrófagos que podem servir de porta de entrada para a disseminação de microorganismos (Kuo, 1993; Campbel, 1995; Moazed, 1997), não está limitada à placa aterosclerótica. Na adventícia essas células são frequentemente encontradas (Laine, 1999). Portanto, estudos incluindo-a poderiam colaborar com o esclarecimento do papel da *C. pneumoniae* e outros agentes na aterosclerose.

A literatura tem mostrado resultados bastante diversos quanto à prevalência da *C. pneumoniae* nas artérias coronárias humanas, em parte devido à diferença de metodologia utilizada. Kuo *et al.* (1993a e 1993b) encontraram, por uma série de estudos soropidemiológicos, resultados significativos de níveis séricos de anticorpos contra *C. pneumoniae* (87%) em pacientes com aterosclerose. Shor e colaboradores (1999) obtiveram



resultados de 71% por imunohistoquímica. Phillips *et al.*, 2000, por microscopia eletrônica encontraram valores próximos de 50%.

No trabalho acima referido realizado no InCor, antígenos de *C. pneumoniae* foram demonstrados, por imunohistoquímica, na adventícia e na íntima de coronárias de todos os pacientes que faleceram de infarto agudo do miocárdio em muito maior quantidade (Higuchi *et al.*, 2003) comparativamente às placas estáveis do mesmo indivíduo. A imunohistoquímica se mostrou método confiável para a quantificação de *C.pneumoniae* em comparação com PCR real-time, onde Mygind e colaboradores (2001) verificaram uma alta correlação entre o método de imunohistoquímica e o PCR-real time para a quantificação de *C.pneumoniae* em animais de experimentação, contrariando alguns trabalhos prévios.

Micoplasmas atuam desequilibrando o sistema imunológico, favorecendo com isso, a proliferação de outros agentes infecciosos (Gabridge, 1971; Henderson, 1996; Razin, 2002 ).

Higuchi *et al.* (2003) encontraram células co-infectadas por *M. pneumoniae* e *C. pneumoniae* nas placas ateroscleróticas rotas de artérias coronárias e propuseram que uma possível interação entre essas bactérias favoreceria a proliferação de ambos os agentes infecciosos, tendo papel fundamental no desenvolvimento da placa instável. Baseando-se nos achados do trabalho acima citado, Momiyama *et al.* (2004) mostraram resultados em relação a níveis séricos de anticorpos que reforçam a hipótese de interação entre ambos os agentes infecciosos: Eles estudaram soropositividade de *M. pneumoniae* em pacientes com e sem doença

coronariana; a diferença foi bastante significativa quando separaram somente os indivíduos com soropositividade para *C. pneumoniae*. Nesse grupo, houve maior prevalência de soropositividade também para *M. pneumoniae* nos indivíduos com doença coronariana (17%), quando comparado aos sem doença coronariana (5%). Somente a soropositividade para *C. pneumoniae* não foi deferente entre pacientes com e sem doença coronariana, sugerindo que a co-infecção por esses agentes pode ser um importante co-fator dessa enfermidade.

O *Mycoplasma pneumoniae*, é uma bactéria conhecida como o menor microorganismo auto-replicante, tendo características peculiares como a necessidade de colesterol para a formação de sua membrana. Em meio de cultura, é sabido, que esse agente necessita da adição do colesterol ao meio para sua sobrevivência (Razin *et al.*, 1998). No presente trabalho observamos que coelhos são freqüentes portadores de baixo nível de infecção crônica por *M.pneumoniae* na parede da aorta.

A alta correlação positiva desses microorganismos com o aumento do espessamento da camada íntima ocorreu tanto no segmento torácico quanto no segmento abdominal, juntamente com o proporcional desenvolvimento de inflamação, reforçando a hipótese de que esses agentes infecciosos estão relacionados com diferentes intensidades evolutivas da doença aterosclerótica.

*M. pneumoniae* tem a característica de induzir aumento de secreção de citocinas pelas células inflamatórias (Pietsch *et al.*, 1994). Seus subprodutos, como as lipoproteínas, são potenciais ativadores de

macrófagos (Brade *et al*, 1999) que hoje se sabe é passo fundamental no desencadeamento e controle da inflamação crônica (Yan, 2005).

A ação do micoplasma na patogenia da aterosclerose possivelmente tem relação com cronicidade e persistência da infecção, possivelmente interferindo na capacidade de reconhecimento do sistema imunológico. Assim, o estudo experimental tem de levar em conta este aspecto de cronicidade. Infecção aguda por *M.pneumoniae* com indução de fenômenos agudos de aterosclerose em camundongos LDL KO não levou a agravamento da aterosclerose, mas a infecção pela *C. pneumoniae* sim. (Hauer *et al.*, 2006).

### **5.2.2 Diferenças entre os segmentos torácico e abdominal da aorta quanto à infecção e remodelamento vascular**

Na patogenia da aterosclerose, uma pergunta que permanece não resolvida é o porque algumas placas evoluem para instabilidade e outras permanecem estáveis, em um mesmo indivíduo. A *C. pneumoniae* tem sido bastante relacionada a eventos isquêmicos agudos. Por outro lado, a placa vulnerável se relaciona com remodelamento positivo e maior inflamação, principalmente na adventícia (Zarins, Glagov, 2001; Meyerson, 2001; Wentzel, 2005).

No presente trabalho, observamos características distintas em relação ao desenvolvimento de aterosclerose entre os segmentos torácico e abdominal da aorta, esta com menos tendência a desenvolver capa de

fibrose, aspecto este fundamental na estabilização da placa. Trabalho de Góis e colaboradores (2006) revela que antígenos de *M.pneumoniae* (MP) e *C.pneumoniae* (CP) estão presentes em lesões ateroscleróticas iniciais da aorta humana e que a maior razão MP/CP tende a proteger o acúmulo de placas na porção subendotelial por macrófagos xantomatosos, o que é acompanhado de mais fibrose e fatores de crescimento. Neste sentido, o presente trabalho confirma este achado, pois nos segmentos de aorta controle sem aterosclerose, e nos segmentos do grupo 8 semanas de dieta rica em colesterol do abdome, onde o espessamento intimal é discreto, a relação MP/CP tende a ser maior do que 2. Já nos segmentos onde há maior espessamento intimal (grupo com 12 semanas de dieta rica em colesterol), a relação MP/CP tende a 1.

Aspecto bastante interessante é o revelado pelo estudo da adventícia e a presença desses agentes infecciosos. No segmento torácico, diferentemente do segmento abdominal, a relação MP/CP na adventícia é próxima de 1 no grupo no controle e grupo B, ou seja, favorecendo o crescimento da placa. Isto pode ter um papel, além do *shear stress* já abordado anteriormente, no maior espessamento intimal. Este é um dado novo que pode melhor explicar o porquê da adventícia ter importância no desenvolvimento da aterosclerose, conforme discutido previamente.

Os nossos dados não são conclusivos, mas levantam a hipótese de que os agentes infecciosos MP e CP, e a quantidade dos mesmos ocorrendo na adventícia previamente ao desenvolvimento da placa, pode influenciar na velocidade da progressão da aterosclerose e de suas complicações, em

paralelo com outros fatores como o colesterol aumentado no sangue e o *shear stress*.

No nosso estudo não tivemos nenhum segmento de aorta com placas rotas. Talvez pelo pouco tempo de evolução máxima estudada (12 semanas de dieta com colesterol). Góis e colaboradores (2006) realizaram estudo de aorta humana onde estudou lesões iniciais e mostrou que a presença de maior proporção de *M.pneumoniae* em relação a *C.pneumoniae* esta relacionada a menor aterogênese.

### **5.2.3 Inflamação, Fibrose e macroscopia**

Na aterogênese, além da espessura da camada íntima (Ross, 1993), fatores responsáveis pela migração e proliferação de células musculares lisas como fatores de crescimento, citocinas liberadas por células endoteliais, monócitos, macrófagos, linfócitos T e plaquetas, estão aumentados devido a uma interação sinérgica entre eles. Dentre os agentes infecciosos estudados, a *Chlamydothila pneumoniae* é o microorganismo mais relacionado a aterosclerose; mais pela detecção in situ nos ateromas do que por níveis de anticorpos no soro (Podsiadly, 2005).

Nosso estudo não analisou níveis de anticorpos no sangue, mas sim a quantificação de antígenos infecciosos nas placas. Os nossos resultados mostraram que a intensidade de inflamação se correlaciona positivamente com a quantidade de agentes infecciosos na placa e na adventícia da aorta, considerando todos os animais em conjunto, ou seja, com e sem dieta rica

em colesterol. Já, a análise dos grupos em separado mostrou que o grupo com maior tempo de dieta rica em colesterol apresentou significativo aumento de inflamação na placa, bem como maior quantidade de agentes infecciosos e de espessamento intimal na parede da aorta.

A presença de maior intensidade de infiltrado inflamatório e de menor fibrose tem sido relacionada ao desenvolvimento de placas instáveis (Ross, 1999; Bezerra, 2001).

O estudo de lesões ateroscleróticas iniciais em aorta ascendente humana de pacientes com aterosclerose sistêmica grave mostrou que o acúmulo progressivo de macrófagos no espaço subendotelial ocorre quando há maior relação de *C.pneumoniae* em relação ao *M.pneumoniae*, o que se acompanha também de maior inflamação no local (Góis, 2006; Higuchi, 2006).

Investigando a área da adventícia, observamos que a correlação do espessamento da mesma com os agentes infecciosos nos dois segmentos, quando ocorreu foi negativa. A análise qualitativa indica que isso é devido a uma diminuição da porção de tecido adiposo dessa camada e aumento da porção de fibrose.

Em relação à porcentagem de fibrose, a placa no segmento abdominal mostrou-se significativamente menor do que a abdominal sugerindo que nessa região as placas podem evoluir para mais instabilidade do que as do segmento torácico. Os aspectos associados à ruptura da placa

---

aterosclerótica incluem um centro lipídico rico, capa fibrótica fina e inflamação progressiva (Moreno, 2002).

Resultado interessante foi o do estudo da macroscopia que mostrou um progressivo aumento na porcentagem de área ocupada por gordura em toda a superfície intimal da aorta, na mesma proporção que o aumento da espessura da placa verificado na histologia. Isto significa que o crescimento da placa ocorre proporcionalmente na extensão da superfície da aorta e na espessura da mesma. Estes resultados são importantes também no sentido de validação da análise microscópica, em que os resultados de um único segmento transversal, seja da aorta abdominal, seja da aorta torácica, mostram proporção de crescimento da camada íntima semelhante à expansão macroscópica.

Outros dados que se correlacionaram positivamente com os agentes infecciosos foram os níveis plasmáticos de colesterol total e suas frações. Vale ressaltar que nos coelhos as lesões são mais ricas em gordura e em macrófagos do que nas placas humanas (Jawien, 2004), talvez pelo pouco tempo de seguimento do experimento e pela intensidade de administração da dieta enriquecida com o colesterol.

## *6 Conclusões*

---

---



A alimentação rica em colesterol levou ao aumento da intensidade de antígenos de *Mycoplasma pneumoniae* e *Chlamidophila pneumoniae* presentes na camada íntima da aorta de coelhos, em correlação com o aumento da espessura intimal e a inflamação na parede do vaso, favorecendo de forma intensa a hipótese de que esses agentes infecciosos têm papel importante na aterogênese.

A presença antígenos de *Mycoplasma pneumoniae* e *Chlamidophila pneumoniae* em pequena quantidade nos animais controles reforça a idéia de que esses microorganismos são habitantes usuais de mamíferos e que fatores de risco como o colesterol induzem sua proliferação e o desenvolvimento da aterosclerose.

Outros fatores como *shear stress* e pressão arterial devem participar na explicação de maior intensidade de aterosclerose no início da aorta torácica descendente do que na porção abdominal, pois a quantidade de agentes infecciosos nessa região não foi maior do que na porção abdominal, nos animais do grupo controle.

O remodelamento negativo e a maior fibrose no segmento torácico do que no segmento abdominal sugerem que as placas na porção torácica podem evoluir para estabilidade.

## *7 Referências*

---

---

- 
- Aalto-Setälä K, Laitinen K, Erkkilä L, Leinonen M, Penttinen I, Saikku P. *Chlamydia pneumoniae* does not increase atherosclerosis in the aortic root of Apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:578-84.
- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Lymphocyte. Cellular and Molecular Immunology.* 2nd ed. Philadelphia: Saunders; 1994.
- Aikawa M, Libby P. Lipid lowering therapy in atherosclerosis. *Semin Vasc Med.* 2004; 4:357-66.
- Aldous MB, Grayston JT, Wang SP, Fog HM. Seroepidemiology of *Chlamydia pneumoniae* TWAR infection in Seattle families. 1966-79. *J Infect Dis.* 1992; 166: 646-
- American Heart Association. *Heart and Stroke Statistical Update.* Dallas, Texas:American Heart Association; 2002.
- Anderson JL, Carlquist JF, Muhlestein JB, Horne BD, Elmer SP. Evaluation of C-reactive protein, an inflammatory marker, and infectious serology as risk factors for coronary artery disease and myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 1998;32(1):35-41.

Anitschkow N, Chalатов S. On experimental cholesterin steatosis and its significance in the origin of some pathological processes (1913). Reprinted in *Arteriosclerosis*. 1983;3:178-82.

Arruda BO, Tolosa EMC, Freitas Neto AG, Rodrigues CJ. *Manual de Técnicas para Histologia Normal e Patológica*. 2a ed. São Paulo: Manole; 2003.

Bharadvaj BK, Marbon RF, Giddens DP. Steady flow in a model of the human carotid bifurcation. Part I-flow visualization. *J. Biomech*. 1982;(15): 349-62.

Balkan J, Kanbagli O, Hatipoglu A, Kucuk M, Cevikbas U, Aykac-Toker G, Uysal M. Improving effect of dietary taurine supplementation on the oxidative stress and lipid levels in the plasma, liver and aorta of rabbits fed on a high-cholesterol diet. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2002;66:1755-8.

Baseman JB, Reddy SP, Dallo SF. Interplay between mycoplasma surface proteins, airway cells, and the protea manifestations of mycoplasma-mediated human infections. *Am J Respir Crit Care Med*. 1975;58:229-42.

Belland RJ, Oullett SP, Giessers J, Byrne GI. Chlamydia pneumoniae and atherosclerosis. *Cel Microbiol*. 2004;6 (2):117-27 (review).

Bezerra HG, Higuchi ML, Gutierrez PS, Palomino SA, Silvestre JM, Libby P, Ramires JA. Atheromas that cause fatal thrombosis are usually large and frequently accompanied by vessel enlargement. *Cardiovasc Pathol*. 2001 4:189-96.

Benson RL, Smith KG, Semenov H. Experimental arteritis and arteriosclerosis associated with streptococcal inoculations. *Arch Pathol*. 1931;12:924-40.

- Blessing E, Campbell LA, Rosenfeld ME, Chough N, Kuo CC. *Chlamydia pneumoniae* infection accelerates hyperlipidemia induced atherosclerotic lesion development in C57BL/6J mice. *Atherosclerosis*. 2001;158(1):13-7.
- Boehler A, Schaffner A, Salomon F, Keusch G. Cytomegalovirus disease of late onset following renal transplantation: a potentially fatal entity. *Scand J Infect Dis*. 1994;26:369-73.
- Brade H, Opal SM, Vogel SN, Morrison DC. Immunomodulation by Mycoplasmas: Artifacts, facts and active molecules. In Razin S, Herrmann R. *Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas*. New York: Kluwer Academic; 2002. p.445-464.
- Brigelius-Flohé R, Kelly FJ, Salonen JT, Neuzil J, Zingg JM, Azzi A. The European perspective on vitamin E: current knowledge and future research. *Am J Clin Nutr*. 2002;76:703-16.
- Buja LM. Does atherosclerosis have an infectious etiology? *Circulation*. 1996; 94: 872.
- Bussab WO, Morettin PA. *Estatística Básica*. 5a ed. São Paulo: Saraiva; 2002.
- Campbell LA, Kuo C-C. *Chlamydia pneumoniae* pathogenesis. *J Med Microbiol* 2002;51:623-25.
- Campbell LA, Kuo C-C, Grayston JT. *Chlamydia pneumoniae* and cardiovascular disease. *Emerg Infect Dis*. 1998;4:571-79.
- Campbell LA, O'Brien ER, Cappuccino AL. Detection of *Chlamydia pneumoniae* TWAR in human coronary atherectomy tissues. *J. Infect Dis*. 1995;172:585-8.

Chambaud I, Wroblewski H, Blanchard A. Interactions between mycoplasmas lipoprotein and the host immune system. *Trends in Microbiology*. 1999;7:493-9.

Chien S, Li S, Shyy JY-J. Effects of mechanical forces on signal transduction and gene expression in endothelial cells. *Hypertension*. 1998; 31:162-169.

Chiu B. Multiple infections in carotid atherosclerotic plaques. *Am Heart J*. 1999; 138(5 Pt 2): S534-6.

Clair RWS. The contribution of avian models to our understanding of atherosclerosis and their promise for the future. *Lab An Sci*. 1998; 48(6): 565-8

Clarkson TB. Nonhuman primate models of atherosclerosis. *Lab An Sci*. 1998; 48(6): 569-72.

Clyde WA, Thomas L. Pathogenesis studies in experimental mycoplasma disease: *M gallisepticum* infections of turkeys. *Am NY Acad Sci*. 1973; 225: 413-24.

Conover WJ. *Practical nonparametric statistics*. 3th ed. New York: Wiley; 1999.

Cook PJ, Honeybourne D. Chlamydia pneumoniae. *J Antimicrob Chemother*. 1994; 34: 859-73.

Crouse JR. Progress in coronary artery disease risk factor research: What remains to be done? *Clin Chem*. 1984;30:1125-27.

Csonka E, Bayer PI, Buki K *et al*. Influence of the measles virus on the proliferation and protein synthesis of aortic endothelial and smooth muscle cells. *Acta Microbiol Hung*. 1990; 37: 193-200.

Cunningham KS, Gotlieb AI. The role of shear stress in the pathogenesis of atherosclerosis. *Lab Invest.* 2005; 85 (7):9-23.

Danesh J, Collins R, Peto R. Chronic infections and coronary heart disease: is there a link? *Lancet.* 1997;350:430-6.

Dardik A, Yamashita A, Aziz F, Asada H, Sumpio BE. Shear stress-stimulated endothelial cells induce smooth muscle cell chemotaxis via platelet-derived growth factor-BB and interleukin-1alpha. *J Vasc Surg.* 2005; 41(2):321-31.

Damy SB, Higuchi ML, Timenetsky J, Sambiase NV, Reis MM, Ortiz SCBC. Co-infection of laboratory rats with *Mycoplasma pulmonis* and *Chlamydia pneumoniae*. *Contemp Top Lab Anim Sci.* 2003;42(1):52-6.

Dayley SJ, Klemp KF, Rogers KA. Cholesterol-fed and casein-fed rabbit models of atherosclerosis. Part 2 *Arterioscler Thromb.* 1994;14:105-14.

De Boer OJ, van der Wall AC, Becker AE. Atherosclerosis, inflammation and infection. *J.Pathol.* 2000;190:237-43.

Dimirov NV, Meyer C, Gilliland D, Ruppenthal M, Chenoweth W, Malone W. Plasma tocopherol concentrations in response to supplemental vitamin E. *Am J Clin Nutr.* 1991;53:723-9.

Dobrin PB. Mechanical factors associated with the development of intimal and medial thickening in vein grafts subjected to arterial pressure: a model of arteries exposed to hypertension. *Hypertension.* 1995; Jul;26(1):38-43.

Dobrin PB, Hodgett D, Canfield T, Mrkvicka R. Mechanical determinants of graft kinking. *Ann Vasc Surg.* 2001;15 (3) 343-9.

Dolery CM, Mcewan JR, Henney AM. Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease. *Circ Res*. 1995;77:863-8.

Ericson K, Saldeen TG, Lindquist O, Pahlson C, Mehta JL. Relationship of *C.pneumoniae* infection to severity of human coronary atherosclerosis. *Circulation*. 2000;101:2568-71.

Esporcatte R, Albuquerque DC, Rocha RM, Rangel FOD. Aterosclerose, inflamação e infecção. *Revista da SOCERJ*. 2004; Jan/fev/mar:19-25.

Espinola-Klein C, Rupprecht HJ, Blankenberg S, Bickel C, Kopp H, Rippin G, Victor A, Hafner G, Schlumberger W, Meyer J; AtheroGene Investigators. Impact of infectious burden on extent and long-term prognosis of atherosclerosis. *Circulation*. 2002;105:15-21.

Ezzahiri R, Nelissen-Vrancken HJMG, Kurvers HAJM, Stassen FRM, Vliegen I, Grauls GELM, van Pul MML, Kitslaar PJEHM, Bruggeman CA. *Chlamydomphila pneumoniae* (*Chlamydia pneumoniae*) accelerates the formation of complex atherosclerotic lesions in Apo E3-Leiden mice. *Cardiovasc Res*. 2002;56:269-76.

Fabricant CG, Fabricant J, Litrenta MM *et al*. Virus-induced atherosclerosis. *J Exp Med*. 1978; 148: 335-40.

Fabricant CG, Krook L, Gillespie JH. Virus-induced cholesterol crystals. *Science*. 1973; 181: 566-7.

Falk E, Shaha PK. Coronary plaque disruption. *Circulation*. 1995;92:657-71.

Fatourae N, Deng X, Champlain A, Guidon R. Concentration polarization of low density lipoproteins (LDL) in the arterial system. *Ann N Y Acad Sci*. 1998; 11;858:137-46.



Finging G, Hanke H, Anitschkow NN (1885-1964). Established the cholesterol-fed rabbit as a model for atherosclerosis research. *Atherosclerosis*. 1997;135:1-7.

Fong IW, Chiu B, Viira E, Fong MW, Jang D, Mahony J. Rabbit model for *Chlamydia pneumoniae* infection. *J. Clin. Microbiol.* 1997;35:48-52.

Fong IW, Chiu B, Viira E, Jang D, Mahony JB. Influence of Clarithromycin on early atherosclerotic lesions after *Chlamydia* infection in a rabbit model. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46:2321-6.

Fong IW. Antibiotics effects in a rabbit model of *Chlamydia pneumoniae*-Induced atherosclerosis. *J Infect Dis.* 2000b;181(3suppl):514-8.

Fong IW. Emerging relationships of infectious diseases and coronary heart disease and atherosclerosis. *Can Med Assoc J.* 2000a;6:891-4.

Fong IW. Infections and their role in atherosclerotic vascular disease. *J Am Dent Assoc.* 2002;133:7S-13S.

Friedewald WT, Levy R, Fredrickson DA. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin. Chem.* 1972;18:499-502.

Gabridge MG and Murphy. Toxic membrane fractions from *Mycoplasma fermentans*. *Infect Immun.* 1971;4: 678-82.

Gilbert A, Lion G. Arterites infectieuses experimentales. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances et Memoires de la Societe de Biologie.* 1889; 41: 583-4.

Góis JM, Higuchi ML, Reis MM, Diament J, Sousa JM, Ramires JAF, Oliveira AS. Infectious agents, inflammation and growth factors. How do they interact

in the progression or stabilization of mild human atherosclerotic lesions? *Ann Vasc Surgery*, in press.

Goldstein JL, Brown MS. The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. *Annu. Rev. Biochem.* 1977; 46: 897-930.

Goldstein JL, Brown MS. Lipoprotein receptors in the liver: control signals for plasma cholesterol traffic. *J. Clin. Invest.* 1983; 72: 743-7.

Grayston JT, Campbell LA, Kuo CC, Mordhorst CH, Saikku P, Thom DH, Wang SP. A new respiratory tract pathogen: *Chlamydia pneumoniae* strain TWAR. *J Infect Dis.* 1990;161:618-25. Review.

Grayston JT, Kuo CC, Wang SP, Altman J. A new *Chlamydia psittaci* strain, TWAR, isolated in acute respiratory tract infections. *N Engl J Med.* 1986; 315:161-8.

Grayston JT, Campbell LA, Kuo CC. *Chlamydia pneumoniae* sp. nov. for *Chlamydia* sp. Strain TWAR. *Int J Syst Bacteriol.* 1989 39 88-90.

Grayston JT. Background and current knowledge of *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis. *J Infect Dis.* 2000;181(Suppl 3): S402-10.

Gupta S, Camm AJ. Chronic Infections *Chlamydia pneumoniae* and Coronary Heart Disease. *The Netherlands*: Kluwer Academic Publishers; 1998.

Gupta S, Camm AJ. *Chronic infection, Chlamydia and coronary heart disease*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 1999.

Gupta S. *Chlamydia pneumoniae* monocyte activation, and azithromycin in coronary heart disease. *Am Heart J.* 1999a;138: 539-41.

Gupta S. Chronic infection in the aetiology of atherosclerosis – focus on *Chlamydia pneumoniae*. [The John French Memorial Lecture]. *Atherosclerosis*. 1999b; 143: 1-6.

Gurmán MA, McMahan CA, McGill JR. Selected methodologic aspects of the international Atherosclerosis Project. *Lab. Invest*. 1968; 18: 479-97.

Hajjar DP, Pomerantz KB, Falcone DJ. Herpes simplex virus infection in human arterial cells. Implications in arteriosclerosis. *J Clin Invest*. 1987; 80: 1317-21.

Hajjar DP, Fabricant CG, Minick CR. Virus-induced atherosclerosis. Herpesvirus infection alters aortic cholesterol metabolism and accumulation. *Am J Pathol*. 1986; 122: 62-70.

Haraszthy VI, Zambon JJ, Trevisan M *et al*. Identification of periodontal pathogens in atheromatous plaques. *J Periodontol*. 2000; 71: 1554-60.

Hansson GK. Cell-mediated immunity in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*. 1998;8:301-11.

Hauer A P, de Vos N, Peterse H, Cate T, Berkel F, Stassen J. Kuiper Delivery of *Chlamydia pneumoniae* to the vessel wall aggravates atherosclerosis in LDL r(-/-) mice. *Cardiovasc Res*. 2006; 1:280-8.

Henderson B, Poole S and Wilson M. Bacterial modulins: a novel class of virulence factors which cause host tissue pathology by inducing cytokine synthesis. *Microbiol. Rev*. 1996; 60:316-41.

Higuchi ML, Gois JM, Higuchi-dos-Santos MH, Diamant J, Sousa JM, Ramires JAF, Oliveira SA. Co-infection rates versus Inflammation, Growth Factors and Progression of Early Atheromas. *APMIS*, in press

Higuchi ML, Reis MM, Sambiase NV, Palomino AS, Castelli JB, Gutierrez PS, Aiello VD, Ramires JA. Coinfection with *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* in ruptured plaques associated with acute myocardial infarction. *Arq. Bras. Cardiol.* 2003; 81:12-22.

Higuchi ML, Gutierrez PS, Bezerra HG, Palomino SA, Aiello VD, Silvestre JM, Libby P, Ramires JA. Comparison between adventitial and intimal inflammation of ruptured and nonruptured atherosclerotic plaques in human coronary arteries. *Arq Bras Cardiol.* 2002; 79(1):20-4.

Higuchi ML, Ramires AF. Infectious agents in coronary atheromas: a possible role in the pathogenesis of plaque rupture and acute myocardial infarction. *Rev. Inst Med trop. S.Paulo.* 2002; 44:217-24.

Higuchi ML, Sambiase N, Palomino S, Gutierrez P, Demarchi LM, Aiello VD, Ramires JA. Association of *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* in fatal ruptured plaques. *Braz J Med Biol Res.* 2000a;33:1023-26.

Higuchi ML, Sambiase N, Palomino S, Gutierrez P, Demarchi LM, Aiello VD, Ramires JA. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* in ruptured atherosclerotic plaques. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2000b;33:1023-6.

Jacobs E. *Mycoplasma pneumoniae* virulence factors and the immune response. *Rev Med Microbiol.* 1991;2: 83-90.

Jander S, Sitzer M, Schumann R, Schroeter M, Siebler M, Steinmetz H, Stoll G. Inflammation in high-grade carotid stenosis: a possible role for macrophages and T cells in plaques destabilization. *Stroke.* 1998; 29: 1625-30.

Jawien J, Nastalek P, Korbut R. Mouse models of experimental atherosclerosis. *J Physiol Pharmacol.* 2004;55:503-17.

Jiaal I, Fuller CJ, Huet BA. The effect of alpha-tocopherol supplementaion on LDL oxidation. A dose-response study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15:190-8.

Jiang Y, Kohara K, Hiwada K. Association between risk factors for atherosclerosis and mechanical forces in carotid artery. *Stroke.* 2000; 31(10):2319-24.

Jones CJ, Singer DR, Watkins NV, Macgregor GA, Caro CG. Abnormal arterial flow in pattern untreated essential hypertension: possible link with the development of atherosclerosis. *Clin Sci .* 1990; 78 (4): 431-5.

Kalayoglu MV, Indrawati, Morrison RP, Morrison SG, Yuan Y, Byrne GI. Chlamydial virulence determinants in atherogenesis: the role of chlamydial lipopolysaccharide and heat shock protein 60 in macrophage-lipoprotein interactions. *J Infect Dis.* 2000;181(suppl3):S483-9. Review.

Kim DW, Langille MK, Wong & Gotlieb AI. Patterns of endothelial microfilament distrution in the rabbit aorta in situ. *Circ. Res.* 1989; (64): 21-31.

Kol A, Sukhova GK, Lichtman AH, Libby P. Chlamydial heat shock protein 60 localizes in human atheroma and regulates macrophage tumor necrosis factor-alpha and matrix metalloproteinase expression. *Circulation.* 1998;98:300-7.

Kowalski M, Rees W, Konturek PC, Grove R, Scheffold T, Meixner H, Brunec M, Franz N, Konturek JW, Pieniazek P, Hahn EG, Konturek SJ, 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.* 2002;34:398-402.

Krause DC, Taylor RD. Mycoplasmas which infect humans. In: Maniloff J, McElaney RN, Finch LR, Baseman JB, editors. *Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis*. Washington (DC): American Society for Microbiology; 1992. p.417-44.

Kumamoto M, Nakashima Y, Sueishi K. Atherosclerosis and angiogenesis. Its pathophysiological significance in humans as well as in an animal model induced by the gene transfer of vascular endothelial growth factor. *Ann N Y Acad Sci*. 1993; 15:311-22.

Kuo CC, Campbel LA. *Chlamidia pneumoniae* pathogenesis. *J Med Microbol*. 2002;52:623-5.

Kuo CC, Campbel LA. Detection of *Chlamydia pneumoniae* in arterial tissues. *J Infect Dis*. 2000;181:432-6.

Kuo CC. Pathologic manifestation of Chlamydial infection. *Am Heart J*. 1999;138:S496-9. Review.

Kuo CC, Jackson LA, Campbell LA. *Chlamydia pneumoniae* (TWAR). *Clin. Microbiol. Rev*. 1995;8:451-61.

Kuo CC, Gown Am, Benditt PP, Grayston JT. Detection of *Chlamydia pneumoniae* in lesions of atherosclerosis by immunocytochemical stain. *Arterioscl Thromb*. 1993; 13:1501-4.

Kuo CC, Shor A, Campbell LA, Fukushi H, PattonDL, Grayston JT. Demonstration of *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerotic lesions of coronary arteries. *J Infect Dis*. 1993; 4:841-9.

Laitinen K, Laurila L, Pyhala M, Saikku P. *Chlamydia pneumoniae* infection induces inflammatory changes in the aortas of rabbits. *Infect Immunol*. 1997;65:4832-5.

Laine P, Kaartinen M, Penttila A, Panula P, Kavanen PT. Association between myocardial infarction and the mast cells in the adventitia of the infarct related coronary artery. *Circulation* 1999; 99: 361-9.

LeBoeuf RC, Doolittle MH, Montcalm A. Phenotypic characterization of the Ath 1 gene controlling high density lipoprotein levels and susceptibility to atherosclerosis. *J Lipid. Res.* 1990; 31: 91-101.

Libby P. The vascular biology of atherosclerosis. In: Brunwald E, Zipes DP, Libby, P, editors. *Heart disease: a textbook of cardiovascular medicine*. 6<sup>a</sup>ed. Philadelphia: Saunders; 2001. p.995-1009.

Libby P. Changing concepts of atherogenesis. *J. Intern. Med.* 2000;247:349-58.

Libby P, Kugiyama K, Nakamura S, Kataoka K, Sugiyama S. Characterization of smooth muscle-like cells in circulating human peripheral blood. *Atherosclerosis*. 2005 Oct 24; [Epub ahead of print].

Lovey P-Y, Morabia A, Bleed D. Long term vascular complications of *Coxiella burnetti* infection in Switzerland: cohort study. *BMJ*. 1999; 319: 284-6.

Luz PL, Serrano CV, Uint L. Papel do endotélio na patogênese da aterosclerose. In: Ramires JA, Lage SHG, Cesar LAM, editors. *Doença coronária e aterosclerose: clínica, terapia intensiva, emergência*. São Paulo: Atheneu; 1998. p.151-6.

Mach F, Schonbeck U, Sukkova GK, Atkinson E, Libby P. Reduccion of atherosclerosis in mice By inhibition of CD40 signalling. *Nature*. 1998; 394:200-3.

Macher AM, Reichert CM, Strauss SE, Longo DL, Parrilo J, Lane HC, Fauci AS, Rook AH, Quinan GV. Death in the AIDS patient: role of cytomegalovirus. *N Engl J Med.* 1983;309:1454.

Mahony JB, Coombes BK. *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis: does the evidence support a causal or contributory role? *FEMS Microbiol. Lett.* 2001; 197: 1-9.

Martinez TA, Gaensly MM. *Helicobacter pylori*: a new cardiovascular risk factor? *Rev. Esp. Card.* 2002;6:652-6.

Mattila KJ. Viral and bacterial infections in patients with acute myocardial infarction. *J. Intern. Med.* 1989; 225: 293-6.

Mayr M, Kiechl S, Willet J, Wick G, Xu Q. Infections, immunity, and atherosclerosis: associations of antibodies to *Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, and cytomegalovirus with immune reactions to heat-shock protein 60 and carotid or femoral atherosclerosis. *Circulation.* 2000;102:833-39.

McIntire LV. Distinguished Lecture: bioengineering and vascular biology. *Ann Biomed Eng.* 1994; 22(1):2-13. Review.

Mendall MA, Goggin PM, Molineaux N. Relation of *Helicobacter pylori* infection and coronary heart disease. *Br Heart J.* 1994; 71: 437-9.

Mehta JL, Saldeen TG, Rand K. Interactive role of infection, inflammation and traditional risk factors in atherosclerosis and coronary artery disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1998; 31: 1217-25.

Meyerson SL, Skelly CL, Curi MA, Shakur UM, Vosicky JE, Glagov S, Christen T, Gabbiani G. The effects of extremely low shear stress on cellular



proliferation and neointimal thickening in the failing bypass graft. *J Vasc Surg.* 2001; 34 4:90-7.

Minick CR, Fabricant GG, Litrenta MM. Atheroarteriosclerosis induced by infection with a herpesvirus. *Am J Pathol.* 1979;96:673-706.

Moos M PW, John N, Gräbner R, Noßmann S, Günther B, Vollandt B, Funk CD, Kaiser B, Habenicht A J R. The Lamina Adventitia Is the Major Site of Immune Cell Accumulation in Standard Chow-Fed Apolipoprotein E-Deficient Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; 25:2386-91.

Momiyama Y, Ohmori R, Taniguchi H, Nakamura H, Ohsuzu F. Association of *Mycoplasma pneumoniae* infection with coronary artery disease and its interaction with chlamydial infection. *Atherosclerosis.* 2004 1:139-44.

Moreno PR, Purushothaman KR, Fuster V, O'Connor WN. Intimomedial interface damage and adventitial inflammation is increased beneath disrupted atherosclerosis in the aorta: implications for plaque vulnerability. *Circulation.* 2002; 21:2504-11.

Moreno PR, Fuster V, Truszczynskah KR, Sharma SK, Badimon JJ, O'Connor WN. Plaque neovascularization is increased in ruptured atherosclerotic lesions of human aorta: implications for plaque vulnerability. *Circulation.* 2004; 14:2032-8.

Moazed TC, Kuo CC, Grayston JT, Campbell LA. Murine models of *Chlamydia pneumoniae* infection and atherosclerosis. *J Infect Dis.* 1997; 175: 883-90

Mosorin M, Surcel HM, Aurila A. Detection of *Chlamydia pneumoniae*-reactive T lymphocytes in human atherosclerotic plaques of carotid artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20:1061-7.

Muhlestein JB, Anderson JL, Hammond EH. Infection with *Chlamydia pneumoniae* accelerates the development of atherosclerosis and treatment with azithromycin prevents it in a rabbit model. *Circulation*. 1998; 97:633-6.

Muhlestein JB, Hammond EH, Carlquist JF, Radicke E, Thomson MJ, Karagounis LA, Woods ML, Anderson JL. Increased incidence of *Chlamydia* species within the coronary arteries of patients with symptomatic atherosclerotic versus other forms of cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol*. 1996;27:1555-61.

Mullenix PS, Andersen CA, Starnes BW, Tacoma, WA. Atherosclerosis as inflammation. *Annals of vascular surgery*. 2005; 19: 130-8.

Mühlradt P, Immunomodulation by Mycoplasmas: Artifacts, facts and active molecules. In *Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas*. ed. Kluwer Academic. New York; 2002. p.445-464.

Myerburg RJ, Interian A JR, Miltrani RM. Frequency of sudden cardiac death and profiles of risk. *Am J Cardiol*. 1997; 80: 10F-19F.

Mygind T, Birkelund S, Falk E, Christiansen G. Evaluation of real-time quantitative PCR for identification and quantification of *Chlamydia pneumoniae* by comparison with immunohistochemistry. *J Microbiol Met*. 2001; 46:241-51.

Naghavi M, Barlas Z, Siadaty S. Association of influenza vaccination and reduced risk of recurrent myocardial infarction. *Circulation*. 2000; 102: 3039.

Naghavi M, Libby P, Falk E. From vulnerable plaque to vulnerable patient. A call for new definitions and risk assessment strategies: Part 1. *Circulation*. 2003a; 108: 1772-1778.

Naghavi M, Libby P, Falk E. From vulnerable plaque to vulnerable patient. A call for new definitions and risk assessment strategies: Part II. *Circulation*. 2003b; 108: 1664-1672.

NCR - National Research Council. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. Washington: National Academic Press; 1996.

Ngeh J, Gupta S. Inflammation, infection and antimicrobial therapy in coronary heart disease – where do we currently stand? *Fundamental Clin Pharmacology*. 2001a; 15: 85-93.

Ngeh J, Gupta S, Goodbourn C, Panayiotou B, McElligott G. Seroprevalence of *Chlamydia pneumoniae* in elderly stroke and medical patients: a case-control study. *Age Ageing*. 2001b; 30-S2: 60

Ngeh J. Chlamydia Pneumoniae in Elderly Patients with Stroke Study (CPEPS): A case-control study on the seroprevalence of *Chlamydia pneumoniae* in patients aged over 65 years admitted with acute stroke or transient ischaemic attack. MSc Dissertation, University of Keele, UK; 2000.

Neter J, Kutner MH, Nachtsheim CJ, Wasserman W. *Applied linear statistical models*. 4th ed. Chicago, Illinois: Irwin; 1996.

Nicoletti A, Caligiuri G, Hansson GK. Immunomodulation of atherosclerosis: myth and reality. *J Intern Med*. 2000;247:397-405.

Noll G. Pathogenesis of atherosclerosis: a possible relation to infection. *Atherosclerosis*. 1998;140(1 suppl):S3-S9.

O'Brien K, Allen M, McDonald T. Vascular cell adhesion molecule 1 is expressed in human coronary atherosclerotic plaques: implications for the mode of progression of advanced coronary atherosclerosis. *J.Clin Invest*. 1994; 92: 945-51.

Oknevich IV, Ryzhenkov VE. Anti-atherosclerotic action of mildronate in experiment. *Patol Fiziol Eksp.* 2002;2:24-7.

Ong G, Thomas BJ, Mansfield AO. Detection and widespread distribution of *Chlamydia pneumoniae* in the vascular system and its possible implications. *J Clin Pathol.* 1996; 49: 102-6.

Paigen B, Mitchell D, Reue K. Ath 1, a gene determining atherosclerosis susceptibility and high density lipoprotein levels in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1987a; 84: 3763-7.

Paigen B, Morrow A, Holmes PA. Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice. *Atherosclerosis.* 1987b; 68: 231-240.

Paigen B, Morrow A, Brandon C *et al.* Variation in susceptibility to atherosclerosis among inbred strains of mice. *Atherosclerosis.* 1985; 57: 65-73.

Pasterkamp G. The Adventitia: An Unrecognised Arterial Layer in Atherogenesis. *Eur Soc cardiol.* 2003; Newcastle. Esc Congress.

Pasterkamp G. The Adventitia: An Unrecognised Arterial Layer in Atherogenesis. *Eur Soc cardiol.* 2003; Newcastle. Esc Congress.

Paton P, Tabib A, Loire R. Coronary lesions and immunodeficiency virus infection. *Res Virol.* 1993; 144: 225-31.

Paszkowiak JJ, Dardik A. Arterial wall shear stress: observations from the bench to the bedside. *Vasc Endovascular Surg.* 2003; 37 (1): 47-57.

Petrie BL, Melnick JL, Adam E. Nucleic acid sequence of cytomegalovirus in cells cultured from human arterial tissue. *J Infect Dis.* 1987; 155: 158-9.

Pietsch K, Ehlers S, Jacob S E. Cytokine gene expression in the lungs of BALB/c mice during primary and secondary intranasal infection with *Mycoplasma pneumoniae*. *Microbiology*. 1994;140:2043-8.

Podsiadly E, Przyluski J, Kwiatkowski A. Presence of *Chlamydia pneumoniae* in patients with and without atherosclerosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2005 24: 507-513.

Razin S, Yogev D, Naot Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol molec biol rev*. 1998;62:1094-156.

Razin S, Herrmann R. Immunomodulation by Mycoplasmas: Artifacts, facts and actives molecules. *Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas*. ed. Kluwer Academic. New York; 2002. p.445-464.

Rekhter MD. How to evaluate plaque vulnerability in animal models of atherosclerosis? *Cardiovasc Res*. 2002;54:36-41.

Roberts A, Thompson JS. Inbred mice and their hybrids as an animal model for atherosclerosis research. *Adv Exp. Med. Biol*. 1976; 67: 313-27.

Rosenfeld ME, Blessing E, Lin TM, Moazed TC, Campbell LA, Kuo CC. Chlamydia, inflammation and atherogenesis. *J Infect Dis*. 2000;181:492-7.

Rosner B. *Fundamentals of biostatistics*. 2<sup>nd</sup> Edition. Massachusetts: Pws publishers; 1986. p.339-42.

Ross R, Glomset JA. Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: proliferation or smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science*. 1953; 180: 1332-9.

Ross R. Atherosclerosis - an inflammatory disease. *New Engl J Med*. 1999;340:115-26.

Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*. 1993;362:801-09.

Rupprecht H, Blankenberg S, Bickel C. Impact of viral and bacterial infectious burden on long-term prognosis in patients with coronary artery disease. *Circulation*. 2001; 104: 25-31.

Saikku P, Leinonen M, Mattila K. Serological evidence of an association of a novel *Chlamydia*, TWAR, with chronic coronary heart disease and acute myocardial infarction. *Lancet*. 1988 ;2:983-86.

Schmitz G, Herr AS, Rohe G. T-lymphocytes and monocytes in atherogenesis. *Herz*. 1998;23:168-77.

Sekiya N, Goto H, Tazawa K, Oida S, Shimada Y, Teresawa K. Keishi-bukuryo-gan preserves the endothelium dependent relaxation of thoracic aorta in cholesterol-fed rabbit by limiting superoxide generation. *Phytoter Res* 2002;16:524-8.

Serrano CV Jr, Ramires JA, Venturinelli M. Coronary angioplasty results in leukocyte and platelet activation with adhesion molecule expression. Evidence of inflammatory responses in coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol*. 1997;29:1276-83.

Shor A, Phillips JI. *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis. *JAMA*. 1999;282(21):2071-3.

Shor A, Phillips JI. *Chlamydia pneumoniae* in atheroma: consideration of criteria for causality *J Clin Pathol*. 1998;51:812-7.

Sigma Stat for windows version 2.03 Copyright © 1992-1997 SPSS Inc.

Sohal RS, Burch GE, Chu KC *et al.* Ultrastructural changes in cardiac capillaries of Coxsackie B4-infected mice. *Lab Invest.* 1968; 19: 399-405.

Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Itztum JL. Beyond cholesterol: modifications of low-density lipoprotein that increase atherogenicity. *N. Engl. J. Med.* 1989; 320: 915-24.

Stéphanie L, Tedgui A. Signal transduction of mechanical stresses in the vascular wall. *Arterioscler Tromb Vasc Biol.* 1998; 32:338-45.

Straka F, Malek I, Stanek V. Coronary disease in patients after heart transplantation. *Cor Vasa.* 1993: 267-75.

Streblow DN, Soderberg NC, Vieira J, Smith P, Wakabayashi E, Ruchti F, Mattion K. The human cytomegalovirus chemokine receptor US28 mediates vascular smooth muscle cell migration. *Cell.* 1999;99(5):511-20.

Suwa T, Hogg JC, Quinlan KB, Ohgami A, Vincent R, Eiden SF. Particulate air pollution induces progression of atherosclerosis. *J Am Col Cardiol.* 2002;39 (6):935-42.

Thompson JS. Atheromata in an inbred strain of mice. *J Atheroscler. Res.* 1969; 10: 113-122.

Timenetsky J, De Luca RR. Detection of *Mycoplasma pulmonis* from rats and mice of São Paulo/SP, Brazil. *Lab. Anim. Sci.* 1998;48:21-213.

Timenetsky J, Metiffogo E. Micoplasmas: características gerais e patogenicidade. Depto de Microbiologia/ ICB II Universidade de São Paulo; 2000. Disponível em: <http://icb.usp.br/~bmm/micoplasmas/características.htm>.

Tracy RP. Inflammation in cardiovascular disease. *Circulation*. 1998;97:2000-02.

Valtonen VV. Role of infections in atherosclerosis. *Am Heart J*. 1999;138:S431-S3.

Vammen S, Lindholt JS, Andersen PL. Antibodies against *Chlamydia pneumoniae* predict the need for elective surgical intervention on small abdominal aortic aneurysms. *Eur J Vas Endovas Surg*. 2001; 22: 165-8.

Vasse M, Pourtau J, Trochon V *et al*. Oncostatin M induces angiogenesis in vitro and in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999; 19: 1835-42.

Vesselinovitsh D, Wissler RW. Experimental production of atherosclerosis in mice. Effects of atherogenic and high-fat diets on vascular changes in chronically and acutely irradiated mice. *J. Atheroscler. Res*. 1968; 8: 497-523.

Vink A, Poppen M, Schoneveld AH, Roholl PJ, de Kleijn DP, Borst C, Pasterkamp G. Distribution of *Chlamydia pneumoniae* in the human arterial system and its relation to the local amount of atherosclerosis within the individual. *Circulation*. 2001;103(12):1613-7.

Vink A, Pasterkamp G, Poppen M, Schoneveld AH, Roholl PJ, de Kleijn DP, Rodoll PJ, Plomp S, Borst C. The adventitia of atherosclerotic coronary arteries frequently contains *Chlamydia pneumoniae*. *Atherosclerosis*. 2001; 157(1):117-22.

Virchow R. *Cellular Pathology*. London: John Churchill; 1858.

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*. 2002;25:S159-S171.



Wentzel JJ, Krams K, Slager CJ. Letter regarding article by Korshunov and Berk, "Strain-dependent vascular remodeling: the 'Glagov phenomenon' is genetically determined". *Circulation*. 2005; 9: 111-9.

Witztum, JL. The oxidation hypothesis of atherosclerosis. *Lancet*. 1994; 344: 793-5.

Yamada T, Oinuma T, Niihashi M, Mitsumata M, Fujioka T, Hasegawa K, Nagaoka H, Itakura H. Effects of *Lentinus edodes* mycelia on dietary-induced atherosclerotic involvement in rabbit aorta. *J Atheroscler Thromb*. 2002;9(3): 149-56.

Yan ZQ, Edfeld K, Swedenborg J, Hanson KG. Toll like receptors2 mediates persistente chemokine release by *Chlamydia pneumoniae* – infected vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25: 2308-14.

Yu YM, Wu CH, Tseng YH, Tsai CE, Chang WC. Antioxidative and hypolipidemic effects of barley leaf essence in a rabbit model of atherosclerosis. *Jpn J Pharmacol*. 2002;89(2):142-8.

Zarins CK , Xu C, Glagov S. Atherosclerotic enlargement of the human abdominal aorta. *Atherosclerosis*. 2001; 1:157-64.

Zarins CK, Zatina MA, Giddens DP, Ku DN, Glagov S. Shear stress regulation of artery lumen diameter in experimental atherogenesis. *J. Vasc. Surg*. 1987; (5):413-20.

Zhu J, Quyyumi AA, Norman JE. The possible role of heppatitis A virus in the pathogenesis of atherosclerosis. *J Infect Dis*. 2000; 182: 1583-7.