SUELI BLANES DAMY

Associação entre infecção experimental por *Mycoplasma* pneumoniae e/ou *Chlamydophila (Chlamydia) pneumoniae* e a intensidade das lesões ateroscleróticas da aorta, em camundongos C57BL/6 apoE KO, com ênfase na diferença entre os sexos

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Profa. Dra. Maria de Lourdes Higuchi

São Paulo 2006 Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1686 FMVZ Damy, Sueli Blanes

Associação entre infecção experimental por *Mycoplasma pneumoniae* e/ou *Chlamydophila (Chlamydia) pneumoniae* e a intensidade das lesões ateroscleróticas da aorta, em camundongos C57BL/6 apoE KO, com ênfase na diferença entre os sexos / Sueli Blanes Damy. — São Paulo: S. B. Damy, 2006.

96 f.: il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, 2006.

Programa de Pós-graduação: Patologia Experimental e Comparada. Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Profa. Dra. Maria de Lourdes Higuchi.

1. Arterosclerose. 2. *C. pineumoniae*. 3. *M. pneumoniae*. 4. C57BL/6 apoE KO. 5. Colesterol. I. Título.



DIRETORIA CLÍNICA

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 29.01.04, APROVOU o Protocolo de Pesquisa nº 1017/03, intitulado: "Estudo da participação de agentes infecciosos no agravamento da aterosclerose" apresentado pela COMISSÃO CIENTÍFICA E DE ÉTICA DO INSTITUTO DO CORAÇÃO.

Pesquisador(a) Responsável: Profa. Dra. Maria de Lourdes Higuchi

Pesquisador(a) Executante: Dra. Sueli Blanes Damy

CAPPesq, 29 de Janeiro de 2004.

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: DAMY, Sueli Blanes Título: Associação entre infecção experimental por Mycoplasma pneumoniae e/ou Chlamydophila (Chlamydia) pneumoniae e a intensidade das lesões ateroscleróticas da aorta, em camundongos C57BL/6 apoE KO, com ênfase na diferença entre os sexos Tese apresentada ao Programa de Pósgraduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências Data: ___/___ Banca Examinadora Prof. Dr. _____ Instituição:_____ Assinatura: Julgamento: Prof. Dr. _____ Instituição:_____ Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____ Julgamento:

Prof. Dr. _____ Instituição: _____ Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____ Julgamento:



Este trabalho foi realizado com o auxílio concedido pela Comissão Nacional de Pesquisa, Processo 477790/2003, na Disciplina de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e no Laboratório de Patologia do Instituto do Coração, HCFMUSP



AGRADECIMENTOS

Profa. Dra. MARIA DE LOURDES HIGUCHI, pelo estímulo e incansável apoio e orientação.

Prof. Dr. ERASMO MAGALHÃES CASTRO DE TOLOSA, Faculdade de Medicina da USP, pela orientação profissional, incentivo e apoio.

Sra. JUNKO TAKANO OSAKA, FMUSP, por ter tornado possível a realização deste trabalho.

Profs. Drs. NELSON FONTANA MARGARIDO e ROBERTO SOUZA CAMARGO, por possibilitarem a realização deste trabalho.

Profa. Dra. HELENICE DE SOUZA SPINOSA e Prof. Dr. LUCIANO FREITAS FELÍCIO, respectivamente, ex e atual Coordenadores do Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

Prof. Dr. MARIO HIROYUKI HIRATA, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, pela doação da bactéria *Chlamydia pneumoniae*.

Prof. Dr. JORGE TIMENETSKY, do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, pela doação da bactéria *Mycoplasma pneumoniae*.

Prof. Dr. ÉDER QUINTÃO, da Faculdade de Medicina da USP, pela doação dos camundongos.

Drs. IDÉRCIO LUIZ SINHORINI e LUIS BENVENUTTI, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP e Instituto do Coração HCFMUSP, pelas valiosas sugestões na qualificação deste trabalho.

Dra. NADIA SAMBIASE, InCor HCFMUSP, pelo incentivo e pela revisão criteriosa.

Sra. ELSA MARIA R.B. FAQUIM, Bibliotecária Supervisora Técnica de Serviços da FMVZ/USP, pela incansável revisão.

Sra. SILVIA A. SOCHIARELLI, Secretária do programa de pós-graduação, FMVZ/USP, pelo apoio administrativo.

A todos os meus amigos da Disciplina de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental e do Laboratório de Patologia InCor, HCFMUSP; Instituto Adolfo Lutz, Instituto de Ciências Biomédicas e Faculdade de Ciências Farmacêuticas/Instituto de Química USP e do Instituto Butantan, cujo apoio irrestrito possibilitou que este trabalho se tornasse realidade.

Dra. MARCIA M. REIS

Dra. MARIA ALICE PEDREIRA DE CASTRO Dr. JOSÉ BYRON VICENTE DIAS FERNANDES

Dra. SILVIA MASSIRONI RENAIDE RODRIGUES FERREIRA ELVIRA MARIA MENDES DO NASCIMENTO FABIANA CRISTINA PEREIRA DOS SANTOS SILVIA COLOMBO

SUELI A. PALOMINO
JULIA MARIA LACHIOMA SILVESTRE
RENATA N. IKEGAMI
JOYCE T.KAWAKAMI
ALESSANDRA ROGGERIO
RAQUEL Q. FAGUNDES
TATIANE SUMIE I. TOKUNAGA
ANTONIO JOSÉ GUEDES
SOLANGE A. CONSORTE
ADRIANA PSOTA
JOANA P. ARAÚJO
FÁTIMA BATISTA CURTO
MARY PENHA PEREIRA
GERSON LILÁ RAMOS

SILVANA BUENO MARQUES

MARINA T. MILANI

JONÉLIA S. DE PEREZ

SERGIO MURILO DE MELLO BORGES

LUCI REZENDE BEVILACQUA

SANDRA MARIA DA SILVA OLIVEIRA

ELIAS APARECIDO MARCELINO

CLAUDIO ANTONIO VIDOTTI

OURISVAL SANTANA SANTOS

ALEXANDRE JANUÁRIO RIBEIRO

DULCINÉIA MARIANO DE SOUZA

VANDA DE ALMEIDA NOVAES

RICARDO SANTO PINHEIRO

CARLOS RIGHETTI
LUCI EBISUI
LUZIANE G. CHAGURI
SILVANIA P.NEVES
TANIA DENISE RÚBIA
VANIA G.M. MATTARAIA

UBIMARA PEREIRA RODRIGUES

RESUMO

DAMY, S. B. Associação entre infecção experimental por *Mycoplasma pneumoniae* e/ou *Chlamydophila (Chlamydia) pneumoniae* e a intensidade das lesões ateroscleróticas da aorta, em camundongos C57BL/6 apoE KO, com ênfase na diferença entre os sexos. [Association between experimental infection by *Mycoplasma pneumoniae* and/or *Chlamydophila (Chlamydia) pneumoniae* and intensity of atherosclerotic lesions in the aorta of C57BL/6 apoE KO mice, with emphasis on the difference between sexes]. 2006. 96 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

Os mecanismos pelos quais os agentes infecciosos, independentes ou não de meio ambiente permissivo, podem promover a aterogênese e as manifestações clínicas não estão completamente esclarecidos. Apesar das numerosas publicações demonstrando a presença de antígenos ou DNA de agentes infecciosos nas placas de ateroma, a questão se o agente infeccioso pode iniciar o processo aterosclerótico ou agravá-lo permanece sem resposta, possibilitando o aprofundamento das pesquisas neste assunto. Desta forma, este trabalho tem como objetivo estudar se a infecção experimental, por *C.pneumoniae* e/ou *M.pneumoniae*, em camundongos C57BL/6 apoE KO induziria ou afetaria a intensidade e a característica de vulnerabilidade da placa ateromatosa, de acordo com o sexo e/ou a dieta rica em colesterol. Métodos: um grupo de camundongos recebeu dieta enriquecida com 1% de colesterol (hiperlipidêmica), e o outro ração com formulação adequada para espécie (normolipidêmica), desde os dois meses de idade. Aos 8 meses de idade foram subdivididos, inoculados com 10⁶ UFI de C.pneumoniae e/ou 10⁶ UFC de M.pneumoniae, por via intraperitoneal, reinoculados um mês após e sacrificados aos 10 meses de idade. Para análise histopatológica secções transversais das aortas torácicas foram processadas para emblocamento em parafina, cortadas com 5 µm de espessura e coradas pelas técnicas de hematoxilina-eosina e tricrômico de Masson. As medianas das variáveis: altura da placa, área da placa, área de gordura da placa, área da artéria, área da luz e porcentagem de obstrução da luz da artéria dos diferentes grupos foram submetidas ao teste de Mann Whitney, com o nível de rejeição de 5%. Resultados: a infecção por C.pneumoniae e/ou M.pneumoniae causou agravamento da aterosclerose tanto em camundongos C57BL/6 apoE KO machos quanto em fêmeas. No entanto, as fêmeas infectadas somente com M.pneumoniae evoluíram com placas mais instáveis, representadas por maior remodelamento positivo. A co-infecção por C.pneumoniae e M.pneumoniae induziu placas mais estáveis, ou seja, com menor conteúdo de gordura e sem remodelamento, tanto nos machos quanto nas fêmeas. A introdução de dieta rica em colesterol levou ao não

desenvolvimento de remodelamento positivo do vaso nas fêmeas infectadas por *M.pneumoniae*, mas sim nas co-infectadas por *C.pneumoniae* e *M.pneumoniae* que apresentaram placas mais instáveis, por serem mais volumosas e com maior conteúdo de gordura. Nos machos houve desenvolvimento de placas mais gordurosas nos infectados por *C.pneumoniae*. Conclusão: A infecção por *C.pneumoniae* e/ou *M.pneumoniae* em camundongos C57BL/6 apoE KO levou ao desenvolvimento ou agravamento de placas de aterosclerose, com diferenças em relação a intensidade e padrões de vulnerabilidade de acordo com o sexo versus o tipo de agente infecciosos. Os subgrupos infectados de fêmeas apresentaram maior agravamento da aterosclerose do que os machos. A dieta rica em colesterol agravou a intensidade da aterosclerose e mudou os padrões de vulnerabilidade dos subgrupos infectados.

Palavras-chaves: Aterosclerose. *C.pneumoniae*. *M.pneumoniae*. C57BL/6 apoE KO. Colesterol.

ABSTRACT

DAMY, S. B. Association between experimental infection by *Mycoplasma pneumoniae* and/or *Chlamydophila (Chlamydia) pneumoniae* and intensity of atherosclerotic lesions in the aorta of C57BL/6 apoE KO mice, with emphasis on the difference between sexes [Associação entre infecção experimental por *Mycoplasma pneumoniae* e/ou *Chlamydophila (Chlamydia) pneumoniae* e a intensidade das lesões ateroscleróticas da aorta, em camundongos C57BL/6 apoE KO, com ênfase na diferença entre os sexos]. 2006. 96 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

Independent of the presence or not a favorable ambient, mechanisms by which infectious agents may boost atherogenesis and clinical aspects are not fully elucidated. In spite of many demonstrations of infeccious agent antigens or DNA, the question if the infection may iniciate or aggravate the atherosclerotic process remains unanswered, requiring further studies. Therefore, the present work studies if the experimental infection of C57BL/6 apoE KO mice by C. pneumoniae and/or M. pneumoniae induces or affects the intensity of atherosclerosis and its characteristics of plaque vulnerability, with regard to the gender and/or the cholesterolrich diet. Methods: a group of mice was fed with 1% cholesterol-enriched diet (hyperlipidemic), from two months of age; the other group received adequately formulated food for the species (normolipidemic). At eight months of age, the mice were subgrouped according to inoculation intra-peritoneally with 10⁶ IFU of C. pneumoniae and/or 10⁶ CFU of M. pneumoniae, and re-inoculation one month later. They were killed at ten months of age. Cross-sectional thoracic aorta fragments were studied in embedded in paraffin block sections stained Hematoxylin-eosin and Masson's trichromic techniques. Differences in the median of the variables: plaque height, plaque area, area of fat plaque, luminal area and percent obstruction of the lumen searched using the Mann Whitney's test, with a 5% level of rejection. Results: the infection by C. pneumoniae and/or M. pneumoniae worsened atherosclerosis in both males and females C57BL/6 apoE KO mice. However, the M. pneumoniae inoculated female group presented more unstable plaques represented by positive remodeling of the vessel. The co-infection by both bacteria induced more stable plaque represented by low fat content and absence of vessel remodeling, in both male and female mice. The introduction of cholesterol enriched diet led to lack of positive vessel remodeling in M.pneumoniae inoculated female group, but development of unstable plaques characterized by large plaque are with high content of fat, in co-infected ones. In male groups there was development of plaque with higher fat content in the subgroup inoculated with *C.pneumoniae*.

Conclusion: Infection by *M. pneumoniae* and/or *C. pneumoniae*, in C57BL/6 apoE KO mice, led to development or aggravation of atherosclerotic plaques, with differences regarding intensity and pattern of vulnerability according to the gender versus type of infectious agents. The infected female groups presented more aggravation of atherosclerosis than male ones. Cholesterol enriched diet aggravated the intensity of atherosclerosis and changed the patterns of vulnerability of infected subgroups.

Key Words: Atherosclerosis. *C.pneumoniae*. *M.pneumoniae*. C57BL/6 apoE KO. Cholesterol.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

UFI - Unidade formadora de inclusãoUFC - Unidade formadora de colônia

°C - Graus Celsius

VLDL - Lipoproteína de muito baixa densidadeILD - Lipoproteína de densidade intermediária

HLD - Lipoproteína de alta densidadeLDL - Lipoproteína de baixa densidade

HSP - Heat Shock ProteinapoE - Apolipoproteina E

ROS - Espécies reativas de oxigênio

O₂ - Ânio superóxido

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

NO₃ - Peróxido nítrico
 oxLDL - LDL oxidada
 NF-κB - Fator nuclear

TNF - Fator de necrose tumoral

IL - Interleucina

M-CSF - Fator estimulante de crescimento de colônia de macrófagos

PDGF - Fator de crescimento derivado de plaquetas

SPF - Livres de patógenos específicos

 $\begin{array}{ccc} mL & & - \ millitro \\ \mu L & & - \ microlitro \\ mm & & - \ milfmetro \\ \end{array}$

mm² - milímetro ao quadrado

μm - micrômetro

μm² - micrômetro ao quadrado

Kg - quilo

SUMÁRIO

1	INT	RODUÇÃO	16
2	REV	VISÃO DA LITERATURA	19
	2.1	FATORES DE RISCO	19
	2.2	PATOGÊNESE DA ATEROSCLEROSE	21
	2.3	OUTROS FATORES DE RISCO	23
		2.3.1 Chlamydophyla (Chlamydia) pneumoniae (C.pneumoniae)	25
		2.3.2 Mycoplasma pneumoniae (M.pneumoniae)	27
		2.3.3 Co-infecção por C. pneumoniae e M. pneumoniae	29
		2.3.4 Suscetibilidade à Aterosclerose ligada ao sexo	30
	2.4	RUPTURA E REMODELAMENTO DAS PLACAS ATEROMATOSAS	31
	2.5	MODELOS BIOLÓGICOS PARA ESTUDO DE PLACA ATEROMATOSA	32
		2.5.1 Modelo de Aterosclerose Ligado ao Sexo	33
3	OB	JETIVOS	35
4	MA	TERIAL E MÉTODOS	36
	4.1	ANIMAIS	36
	4.2	CEPAS DE BACTÉRIAS	37
	4.3	DELINEAMENTO DA PESQUISA	38
	4.4	PREPARO DA RAÇÃO COM 1% DE COLESTEROL	39
	4.5	SACRIFÍCIO DOS CAMUNDONGOS E COLETA DA AORTA	39
	4.6	PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO	40
	4.7	DETECÇÃO DE M.pneumoniae e C.pneumoniae	40
	4.8	ANÁLISE HISTOLÓGICA	40
	4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	42

5	RES	SULTADOS	46
	5.1	FÊMEAS SUBMETIDAS A DIETA NORMOLIPIDÊMICA E	
		INOCULADAS COM AGENTES INFECCIOSOS	46
	5.2	FÊMEAS SUBMETIDAS A DIETA HIPERLIPIDÊMICA E INOCULADAS	
		COM AGENTES INFECCIOSOS	47
	5.3	FÊMEAS SUBMETIDAS A DIETA HIPERLIPIDÊMICA E INOCULADAS	
		COM AGENTES INFECCIOSOS COMPARADAS COM CONTROLES	
		TRATADOS COM DIETA NORMOLIPIDÊMICA	48
	5.4	MACHOS SUBMETIDOS A DIETA NORMOLIPIDÊMICA E	
		INOCULADOS COM AGENTES INFECCIOSOS	48
	5.5	MACHOS SUBMETIDOS A DIETA HIPERLIPIDÊMICA E INOCULADOS	
		COM AGENTES INFECCIOSOS	49
	5.6	MACHOS SUBMETIDOS A DIETA HIPERLIPIDÊMICA E INOCULADOS	
		COM AGENTES INFECCIOSOS COMPARADOS COM CONTROLES	
		TRATADOS COM DIETA NORMOLIPIDÊMICA	49
6	DIS	CUSSÃO	62
	6.1	CONSIDERAÇÕES SOBRE O DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	62
	6.2	CONSIDERAÇÕES SOBRE OS RESULTADOS	64
	6.3	ATEROSCLEROSE E A INFECÇÃO	64
	6.4	A VULNERABILIDADE DAS PLACAS ATEROMATOSAS ASSOCIADAS	
		À INFECÇÃO E AO SEXO	66
	6.5	MECANISMOS DE AÇÃO DOS AGENTES INFECCIOSOS	69
	6.6	ATEROSCLEROSE, SEXO E IDADE	71
	6.7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	72
7	CO	NCLUSÃO	73
REFERÊNCIAS			
APÊNDICES			

1 INTRODUÇÃO

Aterosclerose refere-se, genericamente, ao espessamento ou endurecimento das artérias, envolvendo o depósito de colesterol que atrai células inflamatórias, fibras musculares lisas e, por vezes, depósito de cálcio: a esse acúmulo dá-se o nome de placa de ateroma ou placa ateromatosa. Os principais alvos da aterosclerose são os sistemas cerebral e coronário, assim como a aorta, provocando infartos do miocárdio e cerebrais (acidentes vasculares cerebrais), cardiopatia isquêmica crônica, gangrena das pernas, oclusão mesentérica e encefalopatia isquêmica (COTRAN; KUMAR; ROBBINS, 1989). Trata-se de uma doença com evolução crônica, que pode apresentar fenômenos agudos de ruptura da placa e trombose, iniciando-se nos primeiros anos de vida e apresentando complicações repentinas décadas mais tarde (LIBBY, 2005).

No Brasil, as doenças ateroscleróticas representam a principal causa de morte (MS/FUNASA/Cenepi) e em todo mundo provocam a morte de milhares de pessoas a cada ano, muitas das quais sem apresentar sintomas prévios (MYERBURG et al., 1997). Os métodos de diagnósticos preventivos são ainda insuficientes para identificar as vítimas (NAGHAVI et al., 2003 a, b).

As estrias gordurosas que aparecem na aorta do ser humano após o nascimento, aumentando a sua extensão na segunda década da vida, tiveram sua origem desconhecida por muitos anos. Aceitava-se que a placa fibrosa era o precursor de lesões oclusivas e o principal determinante de risco da doença clínica (COTRAN; KUMAR; ROBBINS, 1989). Modelos animais sugeriram que hiperlipidemia prolongada resultava na progressão de estrias gordurosas para placas fibrosas pela contínua deposição lipídica e outras alterações teciduais.

Com a evolução da ciência, muito conhecimento foi acumulado sobre a aterosclerose, seus fatores de risco ambientais e determinantes genéticos. Nos últimos anos as pesquisas se

voltaram para investigar outras hipóteses de patogênese da aterosclerose nas áreas de imunologia, imunogenética, microbiologia etc. Hoje, vem crescendo o número de pesquisadores que acredita ser a aterosclerose uma doença imuno-inflamatória-fibroproliferativa, podendo ter, em sua etiologia, a participação de agentes infecciosos.

Foram associados à patogênese e/ou agravamento da aterosclerose *Helicobacter pylori* (DANESH; COLLINS; PETO, 1997; PATEL et al., 1995), herpesvírus, citomegalovírus (MELNICK; ADAM; DEBAKEY, 1993), infecções periodontais (BECK et al., 1996) e *Chlamydophila* (*Chlamydia*) *pneumoniae* (*C.pneumoniae*). A co-infecção por *C.pneumoniae* e *Mycoplasma pneumoniae* (*M.pneumoniae*) foi associada ao agravamento e rompimento da placa ateromatosa em pesquisas pioneiras realizadas pela equipe de pesquisadores do Laboratório de Patologia do InCor (HIGUCHI et al., 2000^{ab}; HIGUCHI; RAMIRES, 2002), apontando para a necessidade da presença das duas bactérias para a agudização do processo patológico.

Apesar de quase um século de estudos associando agentes infecciosos à aterosclerose, o tema continua polêmico, uma vez que, a prova definitiva de ser um determinado microorganismo agente etiológico de uma patologia, seria a demonstração do postulado de Koch, em que o patógeno deve estar presente em todos os casos da doença, isolado do paciente e cultivado *in vitro*, reproduzindo os sintomas e lesões histopatológicas quando inoculado em hospedeiro saudável e reisolado deste hospedeiro (LIU; WATERS, 2005).

Os diferentes modelos biológicos utilizados nas pesquisas não reproduzem inteiramente a evolução da aterosclerose no homem, são úteis para o estudo da patogênese, imunologia, tratamento etc, porém não ocorre a agudização da doença representada pela ruptura da placa ateromatosa, formação de trombo, obstrução da artéria e subseqüente agravamento do quadro clínico.

Os roedores não desenvolvem aterosclerose em condições naturais entretanto, com a criação de animais manipulados geneticamente, os pesquisadores passaram a contar com uma ferramenta a mais para o estudo. O camundongo da linhagem C57BL/6 apoE KO desenvolve placas ateromatosas espontaneamente, desde os primeiros estágios de adesão de macrófago com 10 semanas de idade, até o desenvolvimento de ateromas maduros com 24 semanas e tem sido utilizado em inúmeras abordagens de investigação biomédica.

Os mecanismos pelos quais os agentes infecciosos, independentes ou não de meio ambiente permissivo, podem promover a aterogênese e as manifestações clínicas não estão completamente esclarecidos. As pesquisas prévias em muito contribuíram para o atual estágio de conhecimento, entretanto, a questão se o agente infeccioso pode iniciar o processo aterosclerótico ou agravá-lo permanece sem resposta, possibilitando o aprofundamento das pesquisas neste assunto.

Desta forma, este trabalho tem como objetivo estudar se a infecção experimental por *C.pneumoniae* e/ou *M.pneumoniae*, em camundongos C57BL/6 apoE KO, afetaria a intensidade e a morfologia da placa ateromatosa, de acordo com o sexo e/ou a dieta rica em colesterol.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 FATORES DE RISCO

Inúmeros são os fatores de risco correlacionados com a aterosclerose por levarem a disfunção endotelial. Dentre os quais o tabagismo, por induzir a formação de radicais livres, o diabete melito, pela presença de produtos finais de glicosilação, a hipertensão, devido ao aumento de adesividade de monócitos ao endotélio e pela expressão de moléculas de adesão em resposta a angiotensina II, a falta da proteção de estrógeno em mulheres após a menopausa, o sedentarismo e a idade, são alguns exemplos (COTRAN; KUMAR; ROBBINS, 1989; LIBBY, 2005; VIEIRA; RAMIRES, 2003).

As dislipidemias e as dislipoproteinemias estão entre os principais fatores de risco da aterosclerose em geral e das doenças coronarianas em particular (GENEST; LIBBY; GOTTO, 2005), porém, foi somente na década de setenta que ficou demonstrada a estreita relação entre o consumo de gorduras saturadas e colesterol com a aterosclerose (DEWOOD et al., 1980).

Os lipídeos, tais como colesterol, triglicerídeos e fosfolipídeos são transportados em complexos denominados lipoproteínas que, por possuírem domínios hidrófobos e hidrófilos, funcionam como interface no meio aquoso do plasma (RAFFAI et al., 1995).

As várias combinações de lipídios e apolipoproteínas formam partículas de densidade e tamanho diferentes, como os quilomícrons, VLDL (very low density lipoprotein), ILD (intermediate density lipoprotein), HDL (high density lipoprotein) e LDL (low density lipoprotein), que podem ser separadas por ultracentrifugação analítica e são reconhecidas por suas reações com anticorpos específicos e distribuição características; os componentes protéicos atuam como sinalizadores, tanto dirigindo as lipoproteínas para tecidos específicos, como ativando enzimas que agem sobre elas (NELSON; COX, 2004).

O metabolismo dos lipídios foi mais compreendido a partir da caracterização dos receptores das lipoproteínas de baixa densidade nas células (Low density lipoprotein receptor: LDLr), pelos pesquisadores Brown & Goldstein, em 1986. A interação entre as células e as lipoproteínas é complexa, envolvendo proteoglicanos da superfície celular que proporcionam ambiente para a atuação de enzimas lipolíticas (GENEST; LIBBY; GOTTO, 2005).

Os defeitos estruturais ou ausência de apolipoproteínas estão relacionados com anomalias congênitas (CASTRO et al., 1999). A disbetalipoproteinemia familiar ou hiperlipoproteinemia tipo III constitui uma desordem rara, caracterizada pelo acúmulo, no plasma, de partículas lipoprotéicas. Pacientes com esta doença apresentam elevado risco cardiovascular, com sinais patognomônicos representados por xantomas tuberosos e xantomas estriados palmares, níveis de colesterol e triglicerídeos séricos elevados e reduzido HDL. As lipoproteínas remanescentes, quilomícrons parcialmente catabolizados e VLDL, acumulam-se no plasma. Este quadro é conseqüência de anormalidade da apolipoproteina E, que não se liga aos receptores hepáticos (CASTRO et al., 1999; LIBBY, 2005).

A apolipoproteina E (apoE), produzida por células do figado, rim, cérebro e outros tecidos (WEISGRABER, 1994), exerce papel importante no transporte do colesterol devido a sua interação com o receptor de LDL. A isoforma apoE3 liga-se com alta afinidade ao receptor LDL, enquanto a apoE2 tem somente 1% da atividade de apoE3. Esta apoE2 defectiva causa a hiperlipoproteinemia familiar tipo III. A apoE está presente principalmente em VLDL e quilomícrons. A seqüência de DNA que codifica apoE varia levemente, produzindo, assim, diferentes formas que diferem uma da outra por um amino ácido. Esta substituição pode levar às atividades consideravelmente diferentes. Pacientes com hiperlipoproteinemia tipo III tem o genótipo Apo E2/2 e os camundongos deficientes de apoE são amplamente utilizados como modelos biológicos para estudo de aterosclerose (ZHANG; REDDICK; PIEDRAHITA, 1992).

2.2 PATOGÊNESE DA ATEROSCLEROSE

A resposta do endotélio à lesão, proposta por Virchow, no sec. XIX, modificada por Ross (1999), um século após, corresponde à teoria mais aceita pela comunidade científica (FONSECA; IZAR, 2003). A agressão ao endotélio, por inúmeros fatores, provoca uma disfunção da célula endotelial facilitando a adesão de monócitos, infiltração de lipoproteínas e a produção de mitógenos, correspondendo a uma resposta imuno-inflamatória-fibroproliferativa.

Estudos clínicos e epidemiológicos sugeriram que dislipidemia aumenta o risco de eventos coronarianos agudos (LAROSA et al., 1990) e ensaios biológicos em animais confirmaram a hipótese de que hipercolesterolemia leva à formação de placa ateromatosa (ARMSTRONG; HEISTAD, 1990; VESSELINOVITCH, 1988).

Uma dieta rica em colesterol e ácidos graxos saturados favorece o acúmulo de pequenas frações lipoprotéicas na camada de proteoglicanos que recobre o endotélio (SAWAMURA et al., 1997). O prolongamento do tempo de ligação destas pequenas lipoproteínas aos proteoglicanos contribui para a entrada pelas junções das células endoteliais (ACTON et al., 1996; SAWAMURA et al., 1997). Estas partículas lipoprotéicas têm suscetibilidade aumentada a modificações oxidativas, considerada por muitos autores um importante componente da patogênese da aterosclerose (ABIFADEL et al., 2003; MANN et al., 1997; SAWAMURA et al., 1997; van TOL, 2002).

As células vasculares produzem espécies de oxigênio reativo (ROS), incluindo o ânion superóxido O2⁻, peróxido de hidrogênio H₂O₂ e peróxido nitrito NO₃⁻. O excesso de LDL na íntima da artéria, devido a hipercolesterolemia, pode levar a modificações oxidativas, provocando acúmulo de oxLDL (LDL oxidado) em placa ateromatosa humana e em animais experimentais (BERLINER et al., 1995; GRIENDLING; ALEXANDER., 2003; HABERLAND; FONG; CHENG, 1988; YLA-HERTTUALA; PALINSKI; ROSENFELD, 1989).

O estresse oxidativo, correspondente ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio, pode ser provocado por numerosos mecanismos. Estas espécies reativas de oxigênio não são necessariamente patológicas (AMANN et al., 2003) porém, as células vasculares respondem ao estresse oxidativo expressando citocinas pró-inflamatórias e genes pró-aterogênicos. Por exemplo, oxLDL induz as células endoteliais a expressarem moléculas de adesão e quimioquinas, levando ao recrutamento de macrófagos (AIKAWA et al., 2001; BORING et al., 1998; CYBULSKY et al., 200; LI et al., 1993). O acúmulo de macrófagos contribui para a inflamação vascular (AIKAWA et al., 2001; ROSENFELD; ROSS, 1990); que, por sua vez, também é ativada pela oxLDL, passando a expressar o fator nuclear NF-kB que regula o número de genes associados a aterosclerose (COLLINS; CYBULSKY, 2001; SAKAI et al, 2000) e induz a expressão das monocinas TNF-α (Tumor Necrosis Factor), IL-1 β (Interleukin) e M-CSF (Macrophage-Colony stimulant factor) e outras moléculas, levando ainda a uma maior entrada de oxLDL (GRIENDLING; ALEXANDER, 1997).

A placa ateromatosa vai se tornando mais complexa com a chegada de células musculares lisas, vindas da túnica média, atraídas por moléculas secretadas pelos macrófagos (ROSS, 1999); as células musculares lisas também podem se dividir na placa (AIKAWA et al., 1995), ou entrar em apoptose (ISNER et al., 1995), em resposta a citocinas e linfócitos T, que atuam na superfície das células musculares lisas levando-as à morte (GENG et al., 1996).

Além das células, a matriz extracelular também se acumula nas placas ateromatosas, incluindo colágeno intersticial tipo I e III e proteoglicanos (WIGHT, 1995), produzido pelas células musculares lisas estimuladas por PDGF (Platelet-derived growth factor) e TGF β (Transforming growth factor), ambos constituintes dos grânulos de plaquetas e produtos de muitas células encontradas na lesão (AMENTO et al., 1991). Ocorre um balanço entre a síntese e o catabolismo da matriz extracelular, através da ação das enzimas conhecidas como metaloproteinases (DOLLERY; MCEWAN; HENNEX, 1995).

Conforme a placa aumenta de tamanho há necessidade do desenvolvimento da microcirculação, para permitir o tráfego de leucócitos e o crescimento da placa pela difusão de oxigênio e nutrientes; caracteriza-se por um plexo de vasos neoformados, em resposta a peptídeos angiogênicos expressos na placa ateromatosa (O'BRIEN et al., 1993). 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, tais como proteínas morfogenética de osso (LIBBY, 2005).

2.3 OUTROS FATORES DE RISCO

O entendimento do desarranjo do metabolismo lipídico junto com o controle de hipertensão, diabete, tabagismo, estilo de vida e outros parâmetros, levaram a maior controle preventivo de doenças cardiovasculares. Paralelamente, outros riscos foram pesquisados como, por exemplo, a origem do infiltrado inflamatório da placa ateromatosa.

Teoricamente, doenças inflamatórias crônicas poderiam resultar da ação de três diferentes tipos de agentes infecciosos: os organismos fastidiosos previamente conhecidos, os desconhecidos e os indutores de resposta auto-imune. Os dois primeiros podem provocar uma lacuna no diagnóstico e, conseqüente, falta de tratamento, uma vez que dependendo da biologia do agente e de fatores intrínsecos e extrínsecos do hospedeiro a infecção pode persistir resultando em inflamação crônica. O terceiro grupo provoca inflamação persistente mesmo na ausência do agente indutor (CASSEL, 1998).

A difícil correlação entre um agente infeccioso com características incomuns, e um quadro patológico, pode ser ilustrada pela pesquisa da etiologia da doença pulmonar obstrutiva crônica murina. Desde a primeira descrição da broncopneumonia crônica em ratos

(HEKTROEN¹ apud CASSEL, 1998, p.476), até a identificação de *Mycoplasma pulmonis*, como agente etiológico, passaram-se décadas (NELSON, 1940), porém, a ubiquidade do organismo e seu frequente isolamento de animais saudáveis e doentes fizeram com que os micoplasmas fossem considerados comensais, com pequeno potencial patogênico. A demonstração irrefutável de que a infecção por *M.pulmonis* reproduzia todas as características clínicas e patológicas observadas naturalmente, foi realizada inoculando-se animais criados em condições de ausência de microorganismo (germ free) anos mais tarde (CASSEL et al., 1973, 1979).

De acordo com Cassel (1998) e Liu e Waters (2005), a hipótese de causa infecciosa na patogênese ou agravamento da aterosclerose, foi proposta em 1891 por Huchard, complementada por estudos independentes de Wiesner e Weisel (1906) e por Osler (1908). Anos mais tarde o herpesvírus aviário foi associado à aterosclerose (FABRICANT et al., 1978). Desde então inúmeros estudos surgiram (DANESH; COLLINS; PETO, 1997). Em levantamento sorológico de pessoas convalescentes de infarto agudo do miocárdio e doenças cardíacas, detectaram-se altos títulos de anticorpos e imune complexos circulantes contra *C.pneumoniae* (SAIKKU et al., 1988; LINNANMAKI et al., 1993), levando pesquisadores a estimarem que a infecção por *C. pneumoniae* aumenta os riscos de doenças coronarianas (THOM et al., 1991), e elevados títulos de imune complexos, contendo lipopolissacarídeo clamidiano, ser fator de risco independente para o desenvolvimento de isquemia aguda do miocárdio (SAIKKU, 1993).

Outros estudos associaram a aterosclerose a *Helicobacter pylori* (DANESH; COLLINS; PETO, 1997; PATEL et al., 1995), a herpesvírus, a citomegalovirus (MELNICK; ADAM; DEBAKEY, 1993), e às infecções periodontais (BECK et al., 1996, 2005).

¹ HEKTOEN, L. Observations on pulmonary infections in rats. Transactions of the Chicago Pathology Society, v.10, p. 105-108, 1918.

Os efeitos diretos dos agentes infecciosos são sobre a parede vascular, incluindo lise celular (GAYDOS et al., 1996; KAUKORANTA-TOLVANEN et al., 1994), alterações pró-inflamatórias (KAUKORANTA-TOLVANEN et al., 1996) e aumento da atividade pró-coagulante (FRYERT et al., 1997), entre outros. Os efeitos indiretos sistêmicos envolvem indução de proteínas da fase aguda (CASTELL et al., 1990), estabelecimento de estados pró-trombóticos (HEALY; GELEHRTER, 1994), estresse hemodinâmico causado pela taquicardia, aumento do débito cardíaco, ou ativação inflamatória regional em resposta a endotoxemia sistêmica; os efeitos da infecção sistêmica geralmente combinam-se com outros fatores de risco, como por exemplo: fumo, hiperlipidemia, histórico familiar etc. (KOL; LIBBY, 1998)

Apesar de quase um século de estudos associando agentes infecciosos à aterosclerose o tema continua polêmico uma vez que, a prova definitiva de ser um determinado microorganismo agente etiológico de uma patologia, seria a demonstração do postulado de Koch, em que o patógeno deve estar presente em todos os casos da doença, isolado do paciente e cultivado *in vitro*, reproduzindo os sintomas e lesões histopatológicas quando inoculado em hospedeiro saudável e reisolado deste hospedeiro (LIU; WATERS, 2005). Os diferentes modelos biológicos utilizados nas pesquisas não reproduzem inteiramente a evolução da aterosclerose no homem, são úteis para o estudo da patogênese, imunologia, tratamento etc, porém, não ocorre a agudização da doença representada pela ruptura da placa ateromatosa, formação de trombo, obstrução da artéria e subseqüente agravamento do quadro clínico.

2.3.1 Chlamydophyla (Chlamydia) pneumoniae (C.pneumoniae)

Ao gênero *Chlamydia* pertencem 4 espécies: *C. tracomatis, C.psittaci, C.pe*corum e *C.pneumoniae*. As clamídias são parasitas intracelulares obrigatórios estreitamente relacionadas às bactérias gram negativas, multiplicando-se dentro de vacúolos

intracitoplasmáticos que, por não se fundirem com os lisossomos, não sofrem a ação de hidrolases lisossômicas. A morfologia da inclusão varia entre as diferentes espécies de clamídias. Algumas cepas desenvolvem-se dentro de um único vacúolo, denominado corpo reticulado, que se diferencia em corpos elementares. Estes representam a forma infecciosa, adaptada para sobreviver extracelularmente, enquanto a reticulada é metabolicamente ativa, adaptada para se multiplicar no citoplasma. O organismo pode apresentar ainda a forma de "corpúsculo persistente", intracelular, metabolicamente inativa, não replicante, mas viável, permitindo a manutenção da infecção crônica. Os corpos elementares aderem à nova célula hospedeira e penetra no citoplasma por endocitose onde se multiplicam por divisão binária, formando as inclusões características (LIU; WATERS, 2005; MOULDER, 1984; ROCKEY; FISCHER; HACKSTADT, 1996).

A espécie *pneumoniae* foi isolada em 1965 dos olhos de uma criança com tracoma em Taiwan (cepa TW-183) e mais tarde do trato respiratório de um estudante em Seattle, em 1983 (cepa AR-39), posteriormente descritos como da mesma espécie, denominada então TWAR (GRAYSTON, 1992), cujo corpúsculo elementar possui a forma de pêra, ao contrário das demais espécies cujos corpúsculos elementares são redondos (KUO et al., 1993). *C.pne*umoniae provoca infecção persistente e multiplica-se em células endoteliais, células musculares lisas e macrófagos, disseminando-se pelo organismo via macrófagos (MOAZED et al., 1998; YANG; KUO; GRAYSTON, 1995).

As clamídias estão largamente disseminadas, tendo como hospedeiros naturais os mamíferos e as aves. No homem *C.pneumoniae* está associada a várias doenças do trato respiratório, desde faringite até pneumonia, e foi isolada entre 15-20% de adultos e crianças com pneumonia (GRAYSTON, 1992), podendo persistir por meses (HAMMERSCHLAG; CHIRGWIN; ROBLIN, 1992).

Os primeiros pesquisadores a demonstrar a relação entre aterosclerose e *C.pneumoniae* foram Saikku e sua equipe (1988), encontrando elevados títulos de anticorpos contra *C.pneumoniae* em pacientes com doença coronariana. Em placas ateromatosas de vasos humanos a mesma bactéria foi detectada por vários métodos *in situ* (KUO et al., 1993; TAYLOR-ROBINSON; THOMAS, 2000). Estudos *in vitro* sugeriram a ação de *heat shock protein* 60 (HSP60) e do lipopolissacarídio (LPS) clamidianos na formação da célula xantomatosa (KALAYOGLU et al., 2000; KOL; LIBBY, 1998). Em camundongos, o desenvolvimento de placas ateromatosas foi acelerado pela infecção com *C.pneumoniae* com infiltrado inflamatório na íntima (HU; PIERCE; ZHONG, 1999; LIU et al., 2000; MOAZED et al., 1999). Entretanto, outros resultados não confirmaram o envolvimento da bactéria no agravamento da aterosclerose (AALTO-SETALA et al., 2001; BLESSING et al., 2000; CALIGIURI et al., 2001; LIUBA et al, 2000; PISLARU; van der WERFER, 2003).

2.3.2 Mycoplasma pneumoniae (M.pneumoniae)

A infecção causada por *M. pneumoniae* apresenta-se geralmente assintomática, associada ao trato respiratório superior, manifestando-se como pneumonia se houverem condições favoráveis. Os micoplasmas fazem parte de um grande grupo de microorganismos procariotos com mais de 190 espécies (ROTTEM, 2003), distinguindo-se das demais por ser a menor bactéria autoreplicante (RAZIN, 1998), apresentar diminuto genoma (MANILOFF, 1996), e ausência de parede celular. Devido a sua limitada capacidade de biossíntese, algumas espécies são parasitas de hospedeiros e tecidos específicos (RAZIN, 1998). Os micoplasmas possuem ainda a característica de mimetizarem os antígenos do hospedeiro, sobrevivendo dentro de fagócitos e não fagócitos, e de gerar antígenos com composição diferente em sua superfície escapando assim do reconhecimento pelas células hospedeiras. Os mecanismos

pelos quais os micoplasmas interagem e lesam as células hospedeiras eucariotas são pouco conhecidos (ROTTEM, 2003).

Os micoplasmas são ubíquos no reino animal e virtualmente os mamíferos, aves, répteis, anfíbios e peixes que foram testados revelaram espécies de micoplasma específicas. Esta afirmação foi contestada por estudos recentes que demonstraram a presença de *M.bovis, M.agalactiae, M.mycoides* em vários hospedeiros, podendo ser transmitidos facilmente entre ovinos, caprinos e bovinos, sugerindo ser o hospedeiro aquele em que a espécie de micoplasma fosse mais freqüentemente detectada (PITCHER; NICHOLAS, 2005).

O potencial patogênico dos micoplasmas foi demonstrado pela infecção de células embriônicas de camundongos C3H, com *M.fermentans* ou *M.penetrans*, os quais estimularam oncogenes transformando permanentemente as células (ZHANG et al., 1997). Na vagina, onde são encontrados como parte da flora, podem transformar-se em patogênicos, dependendo das circunstâncias (JUDLIN, 2004).

M.pneumoniae, a espécie mais estudada, possui uma expansão polar e core eletron denso, com função de aderência, auxiliando na motilidade (RAZIN, 1992). 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 (ROTTEM, 2003). 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 bacteriana, dentre as quais as nucleases (PADDENBERG et al., 1996), que podem degradar o DNA da célula hospedeira.

Os micoplasmas interagem com os fagócitos mononucleares estimulando a síntese de citocinas pró-inflamatórias (RUUTH; PRAZ, 1989), excretam peróxido de hidrogênio e

radicais superóxidos, possibilitando lesões na membrana das células hospedeiras onde se aderem firmemente (ALMAGOR et al., 1986).

Diferentes estudos relataram a falta de resposta de anticorpos à *M.pneumoniae*, tanto em adultos como em crianças com pneumonia indicando que as pessoas afetadas não respondem da mesma forma à infecção, talvez devido a diferenças genéticas, o que poderia contribuir para a persistência do organismo, assim como suas propriedades imunomoduladoras (BLOCK et al., 1995; CASSELL; DRNEC; WAITES, 1991; HARRIS et al., 1998).

2.3.3 Co-infecção por C. pneumoniae e M. pneumoniae

A associação de *C.pneumoniae* e *M.pneumoniae* foi descrita em diferentes relatos (CASSEL et al., 1985; CORSARO et al., 1999; GRAYSTON, 1992; KRAFT; CASSEL; PAK, 2001; TONG; DONNELLY; HARVEY, 1999), principalmente como causa de doenças respiratórias e, pelo fato de ambos serem microorganismos fastidiosos, podem não ser detectados, uma vez que métodos para diagnóstico não estão rotineiramente disponíveis, mesmo nos melhores laboratórios referências (CASSEL, 1998).

A hipótese de que a co-infecção de micoplasma e clamídia estaria associada à aterosclerose foi descrita por Higuchi e colaboradores em inúmeros estudos em que demonstraram associação de *C.pneumoniae* e *M.pneumoniae* em placas ateromatosas. Os resultados, de uma forma geral, apontaram para a participação do *M.pneumoniae* na patogênese da aterosclerose e sua intima associação com *C.pneumoniae*, o que poderia ser um dos fatores a causar arterite localizada na coronária, ruptura da placa e infarto agudo do miocárdio (HIGUCHI et al., 2000a, HIGUCHI; RAMIRES, 2002). Um estudo experimental anterior demonstrou que a infecção de *M.pneumoniae* em coelhos não produziu aterosclerose

(FONG et al., 1999), favorecendo a hipótese de as duas bactérias, clamídia e micoplasma, serem necessárias para o desenvolvimento da placa instável.

A co-infecção por clamídia e micoplasma foi também encontrada em colônia de ratos convencionais assintomáticos, com detecção dos antígenos bacterianos nos pulmões, figado, coração, rins e baço. Este foi o primeiro relato da infecção natural por clamídias em ratos, demonstrando que, por ser uma infecção assintomática, pode não estar sendo adequadamente diagnosticada (DAMY et al., 2003).

2.3.4 Suscetibilidade à Aterosclerose ligada ao sexo

Após a menopausa, as mulheres apresentam uma predisposição ao infarto do miocárdio e outras complicações da aterosclerose igual à dos homens (GENEST; LIBBY; GOTTO, 2005). Atribui-se às funções do estrógeno, relacionadas a um perfil lipídico mais favorável e a melhor função do endotélio, a proteção das mulheres antes da menopausa (BURKE et al., 1998; GEHARD; GANZ, 1995).

Estudos epidemiológicos mostraram que o espessamento das túnicas íntima e média da artéria carótida é maior nos homens, em comparação às mulheres, e que esta espessura aumenta em ambos os sexos com a idade, sendo nas mulheres um forte indicador de subseqüentes riscos de doença coronariana clínica (CHAMBLESS et al., 1997). A calcificação da artéria aorta, torácica e abdominal, também foi associada com o aumento do risco a doenças cardiovasculares tanto em homens como em mulheres (KULLER et al., 1999; WITTERMAN; KOK; van SAASE, 1986).

Em análise da mortalidade provocada por doenças coronarianas em estudo realizado nos Estados Unidos, os resultados demonstraram uma significante diferença nos índices de mortalidade entre brancos e negros (HO; PAULTRE; MOSCA, 2005). Na população branca os homens apresentaram um risco seis vezes maior do quando comparado às mulheres

brancas, quando jovens, e na população negra a diferença foi menos pronunciada, apresentando os homens um risco duas vezes maior quando comparados às mulheres negras, também jovens. Estes resultados sugerem que outros fatores de riscos, como a variação étnica, poderiam estar influenciando a resistência ou suscetibilidade das mulheres.

2.4 RUPTURA E REMODELAMENTO DAS PLACAS ATEROMATOSAS

A trombose significa o mecanismo de transição entre a fase crônica para a aguda da aterosclerose entre os seres humanos. A ruptura física da placa comumente causa trombose aguda, podendo ocorrer por dois mecanismos, um envolvendo a fratura da capa fibrosa da placa (FALK; SHA; FUSTER, 1995), e o segundo envolvendo uma erosão superficial da íntima (LIBBY, 2005).

A principal resistência da capa fibrosa é dada pelo colágeno. Assim, fatores que diminuem a síntese de colágeno pelas células musculares lisas podem favorecer o rompimento da capa (AMENTO et al., 1991). O catabolismo aumentado da matriz extracelular deve contribuir para a ruptura e, por outro lado, enzimas que degradam a matriz contribuem para a migração de células musculares lisas e remodelamento arterial (LENDON et al., 1991; LOREE et al., 1992).

As placas ateromatosas que apresentam predominância de matriz extracelular, menor quantidade de lipídeos e infiltrado inflamatório, porém maior obstrução do lúmen da artéria, portanto um remodelamento negativo, são menos passíveis de sofrerem ruptura. Esta característica de placas ateromatosas apresentando infiltrado inflamatório estarem associadas ao agravamento da aterosclerose, direcionaram e direcionam as hipóteses dos pesquisadores sobre envolvimento de agentes infecciosos na doença.

2.5 MODELOS BIOLÓGICOS PARA ESTUDO DE PLACA ATEROMATOSA

As aves foram os primeiros animais a serem usados no estudo de aterosclerose. Em 1959, Clarkson; Prichard; Netsky demonstraram a aterosclerose em pombas alimentadas com dieta aterogênica, tendo ainda relatado infarto agudo do miocárdio em pombas idosas em conseqüência de ruptura da placa ateromatosa, característica única entre os modelos animais. As pombas são os únicos modelos, com exceção de primatas não humanos, que consomem dieta aterogênica por pelo menos 10 anos, nos quais a trombose associada com aterosclerose experimental é encontrada.

Os roedores não desenvolvem aterosclerose em condições naturais. Segundo Smith (1998), os camundongos como modelo de aterosclerose induzida por dieta, foram utilizados na década de sessenta, porém sem muito sucesso. Paigen realizou trabalho pioneiro no mapeamento dos genes envolvidos na aterogênese, utilizando a abordagem da genética clássica e empregando linhagens isogênicas recombinantes alimentadas com dieta aterogênica modificada (PAIGEN et al., 1985; SMITH, 1998).

Mais tarde, em trabalhos independentes e concomitantes, equipes diferentes criaram camundongos com fenótipos idênticos, deletados da apolipoproteína E (apoE) (van REE et al., 1994). Estes camundongos desenvolvem ateroclerose mesmo quando alimentados com dieta normal devido a algumas frações de lipoproteína não conseguirem se ligar a receptores das células pela falta de apoE para a ancoragem. As placas ateromatosas neste modelo biológico se desenvolvem espontaneamente, desde os primeiros estágios de adesão de macrófago com 10 semanas de idade, até o desenvolvimento de ateromas maduros com 24 semanas (MOAZED et al., 1997).

As linhagens de camundongos apresentam suscetibilidades diferentes às infecções.

Os camundongos apoE KO foram submetidos à infecção por *C.pneumoniae*, por diferentes

vias e esquema de inoculações, apresentando aumento das lesões ateroscleróticas associadas à infecção (BURNETT et al., 2001; MOAZED et al., 1999; ROTHSTEIN et al., 2001). Em outros estudos a associação entre infecção e agravamento da aterosclerose não foi verificada (AALTO-SETALA et al., 2001; LIUBA et al., 2000, 2003). Os resultados conflitantes observados foram atribuídos às variações na virulência das cepas de *C.pneumoniae*, aos diferentes esquemas de imunizações, bem como a idade do hospedeiro (De KRUIF et al., 2005).

As propriedades aterogênicas de *C.pneumoniae* foram também demonstradas em estudos utilizando ratos, coelhos e porcos, sugerindo que os resultados poderiam ser extrapolados para o ser humano (FONG et al., 1999; De KRUIF et al., 2005; PISLARU; van der WERF, 2003). Apesar de todos estes trabalhos, os mecanismos pelos quais os agentes infecciosos, independentes ou não de meio ambiente permissivo, podem promover a aterogênese e as manifestações clínicas ainda estão longe de estarem esclarecidos. A questão se o agente infeccioso pode iniciar o processo aterosclerótico ou agravá-lo permanece aberta, possibilitando o aprofundamento das pesquisas neste assunto.

Não foram encontradas na literatura pesquisas associando a infecção por *M.pneumoniae* com aterosclerose em camundongos apoE KO. Esta associação foi feita em estudo em coelhos, cujos resultados não apontaram participação dos micoplasmas no aumento da lesão ateromatosa (FONG et al., 1999).

2.5.1 Modelo de Aterosclerose Ligado ao Sexo

Apesar das evidências clínicas da proteção das mulheres à aterosclerose, praticamente não existem dados de literatura sobre o impacto do sexo no desenvolvimento de aterosclerose experimental *versus* infecção.

Assim como acontece em diferentes áreas de investigação biomédica, os machos são preferidos como modelo biológico por não apresentarem variação hormonal cíclica. Em estudos realizado por Burnett et al. (2001), co-infectando os camundongos apoE KO com citomegalovírus e clamídia, verificaram que as fêmeas não inoculadas, apresentaram área de lesão de placa ateromatosa até duas vezes maior do que os machos.

3 OBJETIVOS

Utilizando como modelo biológico o camundongo apoE KO que tem propensão ao desenvolvimento de aterosclerose, verificar:

- 1. Se a infecção por *C.pneumoniae* ou *M.pneumoniae* induz o desenvolvimento de aterosclerose.
- 2. Se a infecção e o sexo influenciam nas características de vulnerabilidade da placa.
- 3. Se a co-infecção por *C.pneumoniae* e *M.pneumoniae* modifica a intensidade e as características histopatológicas de placas ateromatosas induzida por infecção somente por *C.pneumoniae* ou *M.pneumoniae*.
- 4. Se a introdução de dieta enriquecida com colesterol interfere nessas características.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Camundongos geneticamente alterados apoE KO, homozigoto para a deleção do gene apolipoproteina E (apoE /), foram recebidos da Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine, USA) e gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Éder Quintão. A fim de eliminar contaminantes, no Biotério de Experimentação da Disciplina de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental da FMUSP, os camundongos foram submetidos a uma rederivação sanitária, através de cesariana asséptica, a fim de eliminar organismos patogênicos específicos (SPF=specific pathogen free), particularmente micoplasmas e clamídias. O útero contendo os fetos da linhagem apoE KO foi introduzido por meio de um banho germicida no interior de um isolador flexível (Veco do Brasil, Campinas). No interior do isolador os fetos foram retirados do interior do útero, reanimados, sendo então introduzidos em um ninho de uma fêmea de camundongo BALB/c SPF, recém parida, mantida no interior do isolador e recebida do Biotério de Experimentação do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, gentilmente cedida pela Dra. Silvia Massironi. Os camundongos desmamados foram transferidos para microisoladores e manipulados em capela de fluxo laminar. A higienização consistiu de 2 trocas por semana da cama de maravalha autoclavada, água filtrada e ração com formulação adequada para a espécie (Guabi - Mogiana Alimentos S.A, Campinas, SP-BR), esterilizada por raios gama (Embrarad, Cotia); tanto a água quanto a ração foram fornecidos ad libitum. As condições ambientais mantidas na sala foram de 23°C \pm 2 °C, ciclo de luz e escuridão de 12/12 horas.

Os controles bacteriológicos e sorológicos dos camundongos desmamados foram realizados pelo Laboratório de Bacteriologia do Biotério Central e pelo Biotério de

Experimentação do ICB/USP, cujos resultados não apontaram a presença de organismos patogênicos específicos.

Todos os procedimentos utilizados neste trabalho foram aprovados previamente pela Comissão de Ética do HCFMUSP, e estão de acordo com as normas internacionais (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1996).

4.2 CEPAS DE BACTÉRIAS

C. pneumoniae

A cepa TWAR AR-39 (ATCC 53592) foi adquirida do American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA), e gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Mario Hirata. A bactéria foi cultivada no laboratório de Riquétsias do Instituto Adolfo Lutz, em células Hep2 e meio de cultura mínimo essencial Eagle, com 10% de soro fetal bovino, cicloheximide 1 μg/mL, vancomicina 25 μg/mL, gentamicina 10 μg/mL, anfotericina B 3 μg/mL. As bactérias foram repicadas a cada 72 horas e o crescimento monitorado por imunofluorescência indireta e os títulos foram expressos como unidade formadora de inclusão por mililitro (UFI/mL) (LI; WATERS, 2005).

M. pneumoniae

Foi utilizada a cepa FH de *Mycoplasma pneumoniae*, obtida do Laboratório do Dr. M.F.Barile (FDA/NIH – Bethesda – EUA), gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Jorge Timenetsky. A bactéria foi inicialmente subcultivada em 20,0 mL de caldo SP4 (TULLY, 1995), a 37°C em aerobiose. Após 5 dias houve a alteração do pH do caldo sem turvação. A cultura foi distribuída em alíquotas de 1 mL e congelada a -70°C. A determinação de

unidades formadoras de colônias (UFC) ocorreu após o descongelamento de duas alíquotas.

Esta suspensão foi diluída de 10⁻¹ a 10⁻⁹ em tubos (12 x 72 mm) com 2mL do caldo SP4.

Cem microlitros de cada diluição foram semeados em duplicatas em placas com ágar SP4

para contagem de colônias. Após 7 dias de incubação a 37°C, em aerobiose, houve

desenvolvimento de colônias obtidas das diluições, que produziram entre 30 e 300 colônias. A

média das contagens de colônias permitiu obter as UFC de M. pneumoniae/mL (RODWELL;

WHITCOMB, 1985).

4.3 **DELINEAMENTO DA PESQUISA**

Aos 2 meses de idade, 139 camundongos machos e fêmeas, foram divididos em dois

grupos, um recebendo ração com 1% de colesterol e o outro recebendo ração normal. Aos 8

meses de idade, os grupos foram subdivididos em 4, conforme segue:

GRUPO SEM COLESTEROL

Controles não inoculados: 9 fêmeas, 6 machos

Inoculados com *C.pneumoniae*: 8 fêmeas, 8 machos

Inoculados com *M.pneumoniae*: 5 fêmeas, 8 machos

Inoculados com *M.pneumoniae* e *C.pneumoniae*: 9 fêmeas, 10 machos

GRUPO COM COLESTEROL

Controles não inoculados: 11 fêmeas, 7 machos

Inoculados com *C.pneumoniae*: 8 fêmeas, 9 machos

Inoculados com *M.pneumoniae*: 12 fêmeas, 13 machos

Inoculados com *M.pneumoniae* e *C.pneumoniae*: 9 fêmeas, 7 machos

Foram inoculados com uma dose de 10⁶ UFC/camundongo de *M.pneumoniae* e 10⁶ UFI/camundongo de *C.pneumoniae*, dissolvidos em um volume de 100 μl de solução salina por via intraperitoneal; reinoculados com a mesma dose, após 30 dias e sacrificados 60 dias após a primeira inoculação, com aproximadamente 10-11 meses de idade. Os controles receberam 100 μL de solução salina estéril por via intra-peritoneal.

4.4 PREPARO DA RAÇÃO COM 1% DE COLESTEROL

A ração comercial foi pulverizada com 10 g de colesterol (Sigma – C8503, 95% de pureza USP), veiculado em 50 mL de éter etílico e 100 mL de álcool 70° (Farmácia do HCFMUSP), permanecendo em capela de exaustão de ar por 24 horas para eliminar o efeito tóxico do éter. A cada 15 dias era produzido um lote de 5 quilos de ração (DAMASCENO, 1997).

4.5 SACRIFÍCIO DOS CAMUNDONGOS E COLETA DA AORTA

Os camundongos foram anestesiados, por via intraperitonial, com 25 mg/kg de peso de ketamina (Parke-Davis) e 5 mg/kg de xilazina (Bayer). Aproximadamente 5 minutos após a profundidade da anestesia foi assegurada pela taxa respiratória, indicadores de tônus muscular e ausência de reflexos interdigitais. Foram colocados em placa de dissecção e contidos. As cavidades torácicas e peritoneal foram abertas e, com um Buterfly 27 G heparinizado, foi feita uma punção intracardíaca na base do ventrículo esquerdo para coleta de aproximadamente 1 mL de sangue; em seguida os órgãos foram perfundidos com formol tamponado a 10%, em

pressão fisiológica. Quando a palidez dos órgãos indicavam que a perfusão estava satisfatória, as amostras de tecidos eram coletadas.

4.6 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

A aorta torácica foi representada em cortes transversais, na altura do arco. As amostras foram submetidas às técnicas histológicas tradicionais, cortadas a 5 μm por um micrótomo semi-automático (LEICA 2145), as secções foram colocadas em lâminas silanizadas com aminopropyltriethoxysilane a 2% em acetona pura, resultando em maior aderência do corte. A seguir foram coradas pela técnica de tricrômico de Masson.

4.7 DETECÇÃO DE M.pneumoniae e C.pneumoniae

A detecção dos microorganismos na placa foi feita por microscopia eletrônica, segundo a técnica de Reynolds (1963). As amostras foram observadas em microscópio eletrônico de transmissão Philips EM-301.

4.8 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Todas as lâminas histológicas foram analisadas em um sistema de imagem digital Leica (Quantimet 500), constituído por um microscópio acoplado a um computador que digitaliza as imagens e permite medidas morfométricas e quantificações de tecidos por meio de diferenças de gradientes de cor.

a) Morfometria

Nas lâminas coradas pelo Tricrômio de Masson, que destaca o tecido conjuntivo, foram realizadas as seguintes medidas (Figuras 1 e 2):

- Perímetro da luz potencial da artéria, correspondente à lâmina elástica interna (LEI) mm
- Perímetro da artéria, correspondente à lâmina elástica externa (LEE) mm
- Área da placa mm²
- Altura maior da placa mm
- Área de gordura da placa mm²
- **b)** Composição: no estudo da composição da placa foi quantificado o porcentual de área ocupado pela gordura na placa ateromatosa.

No processamento histológico foi utilizado o xilol como solvente para tornar o tecido miscível à parafina, dissolvendo, porém, a gordura. Desta forma, a gordura foi quantificada de maneira indireta, em coloração pelo Tricrômico de Masson, medindo-se as áreas claras correspondentes à imagem negativa da gordura (Fig. 3). Essas áreas foram quantificadas automaticamente sendo o resultado a soma de todas as áreas gordurosas.

c) Cálculos: Foram utilizadas as seguintes fórmulas:

Área da artéria = $(perímetro da aorta)^2$

Área da luz potencial da artéria = $(\underline{perímetro da luz da aorta})^2$

Porcentagem de estenose = <u>Área da luz do vaso</u> x 100 Área da luz potencial do vaso

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados obtidos na análise das secções da aorta de grupos camundongos C57BL/6 apoE KO inoculados por *M.pneumoniae* e/ou *C.pneumoniae*, tratados com dieta hiperlipidêmica ou normolipidêmica, foram comparados com dois grupos controles: um controle formado por camundongos, da mesma linhagem, não inoculados e tratados com dieta hiperlipidêmica e o outro grupo, com o mesmo modelo biológico, não inoculado e tratado com dieta normolipidêmica. Foram comparados também os grupos inoculados tratados com dieta hiperlipidêmica, com o controle que recebeu dieta normolipidêmica.

Os resultados obtidos das medidas foram analisados pelo programa Sigma Stat para Windows, versão 1,0 (Sigma Chemical, Co, St Louis, MO, EUA), aplicando-se o teste de Mann-Whitney para comparação das medianas. Os valores de P<0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

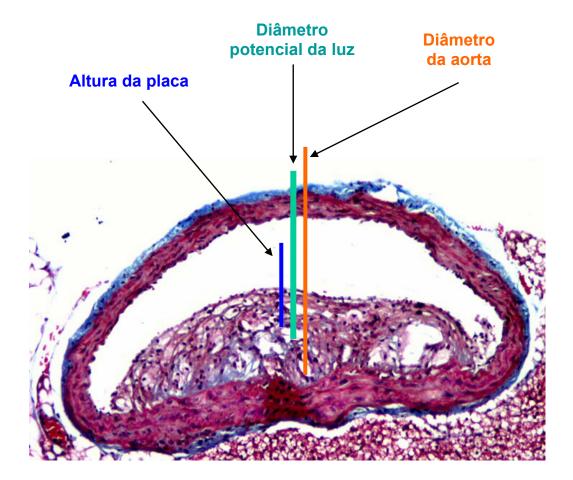


Figura 1. Representação de algumas das medidas morfométricas

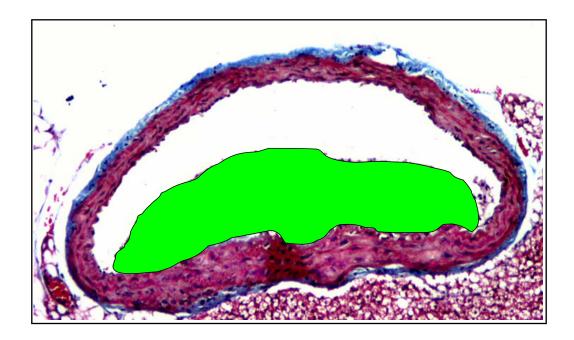
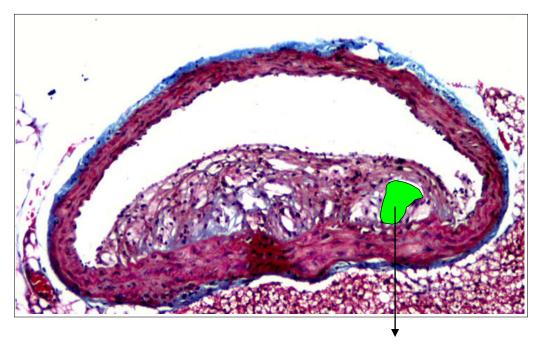


Figura 2. Representação da área da placa



Fração de gordura na placa

Figura 3. Representação da área de gordura da placa ateromatosa

5 RESULTADOS

No período de observação pós-infecção os camundongos não apresentaram sinais de doenças, porém foram registrados os seguintes óbitos: quatro machos inoculados com *M.pneumoniae*, uma fêmea e um macho inoculados com *M.pneumoniae* e *C.pneumoniae*, todos pertencentes ao grupo tratado com dieta hiperlipidêmica. A causa da morte não foi determinada.

A confirmação da infecção foi feita através de exames de amostras da aorta de camundongos inoculados ao microscópio eletrônico. A figura 4 ilustra uma amostra positiva, observando-se um organismo elétron denso, com membrana celular simples, adjacente ao endotélio, representativo de um micoplasma. No citoplasma desta mesma célula, observa-se um organismo com membrana dupla, formato piriforme, núcleo denso, representativo de clamídia.

Os aspectos microscópicos da secção da aorta dos camundongos apoE KO, dos diferentes grupos de fêmeas e machos, estão representados nas figuras 5, 6, 7 e 8.

As medianas das variáveis compreendendo: altura da placa; área da placa e área de gordura da placa ateromatosa; área da luz potencial e área da artéria aorta; porcentagem de obstrução da luz da artéria, realizadas nos grupos inoculados e os respectivos controles, estão representados nas tabelas 1 a 6, realizadas nos grupos inoculados e os respectivos controles.

5.1 FÊMEAS SUBMETIDAS A DIETA NORMOLIPIDÊMICA E INOCULADAS COM AGENTES INFECCIOSOS

Os valores das medianas dos grupos de fêmeas infectadas e tratadas com dieta normolipidêmica, comparado ao controle que recebeu a mesma dieta, estão representados na tabela 1. Os valores foram significantemente maiores nas variáveis: altura da placa

ateromatosa (P=0,002), área da placa ateromatosa (P=0,001), área de gordura da placa (P=0,002) e porcentagem de obstrução da luz (P<0,001), entre as inoculadas com *C.pneumoniae*.

As inoculadas com *M.pneumoniae* apresentaram valores significantemente maiores nas variáveis: área da placa ateromatosa (P=0,008), área de gordura da placa ateromatosa (P=0,008); área da luz da artéria (P=0,033); área da artéria aorta (P=0,033); porcentagem de obstrução da luz (P=0,008).

Quanto às fêmeas inoculadas com ambas bactérias, foram observados valores maiores nas seguintes variáveis: altura da placa (P=0,030) e porcentagem de obstrução da luz (P=0,030).

5.2 FÊMEAS SUBMETIDAS A DIETA HIPERLIPIDÊMICA E INOCULADAS COM AGENTES INFECCIOSOS

A tabela 2 ilustra as medidas realizadas nos grupos de fêmeas inoculadas e tratadas com dieta hiperlipidêmica, comparadas aos controles tratados com a mesma dieta. Houve valores maiores nas variáveis área da placa ateromatosa (P=0,023) entre as inoculadas com *C.pneumoniae*.

As inoculadas com *M.pneumoniae* não apresentaram valores significantemente maiores das variáveis quando comparados aos valores do grupo controle.

Quando inoculadas com as duas bactérias, as seguintes variáveis apresentaram valores maiores: altura da placa ateromatos (P=0,043); área da placa ateromatosa (P=0,023); área de gordura da placa (P=0,035); área da luz da artéria (P=0,023).

5.3 FÊMEAS SUBMETIDAS A DIETA HIPERLIPIDÊMICA E INOCULADAS COM AGENTES INFECCIOSOS COMPARADAS COM CONTROLES TRATADOS COM DIETA NORMOLIPIDÊMICA

Quando os valores das variáveis estudadas do grupo de fêmeas inoculadas e tratadas com dieta hiperlipidêmica foram comparadas com o controle tratado com dieta normolipidêmica, tabela 3, foram significantemente maiores: altura da placa ateromatosa (P=0,002); área da placa ateromatosa (P<0,001); área de gordura da placa (P=0,002); porcentagem de obstrução da luz (P<0,001), entre as inoculadas com *C.pneumoniae*.

As inoculadas com *M.pneumoniae* apresentaram os valores significantemente maiores para: altura da placa ateromatosa (P=0,002); área da placa ateromatosa (P=0,003); área de gordura da placa (P=0,002); porcentagem de obstrução da luz (P=0,004).

Para as inoculadas com as duas bactérias, os valores maiores das variáveis foram para: área da placa ateromatosa (P=0,043); área da placa ateromatosa (P<0,001); área de gordura da placa (P<0,001); porcentagem de obstrução da luz (P<0,001).

5.4 MACHOS SUBMETIDOS A DIETA NORMOLIPIDÊMICA E INOCULADOS COM AGENTES INFECCIOSOS

Os valores das medianas dos grupos de machos infectados e tratados com dieta normolipidêmica, comparados ao controle que recebeu a mesma dieta, estão representados na tabela 4. Houve valores significantemente maiores nas variáveis: área da placa ateromatosa (P=0,013); porcentagem de obstrução da luz (P=0,013), entre os inoculados com *C.pneumoniae*.

Os inoculados com *M.pneumoniae* não apresentaram valores significantemente maiores nas variáveis.

Quanto aos machos inoculados com ambas bactérias, foram observados valores maiores para: área da placa ateromatosa (P=0,029).

5.5 MACHOS SUBMETIDOS A DIETA HIPERLIPIDÊMICA E INOCULADOS COM AGENTES INFECCIOSOS

A tabela 5 ilustra as medidas realizadas nos grupos de machos inoculados e tratados com dieta hiperlipidêmica, comparadas aos controles tratados com a mesma dieta. Houve valores maiores para a variável área de gordura da placa ateromatosa (P=0,044) entre os inoculados com *C.pneumoniae*.

Os inoculadas com *M.pneumoniae* ou com as duas bactérias não apresentaram valores significantemente maiores das variáveis quando comparados aos valores do grupo controle.

5.6 MACHOS SUBMETIDOS A DIETA HIPERLIPIDÊMICA E INOCULADOS COM AGENTES INFECCIOSOS COMPARADOS COM CONTROLES TRATADOS COM DIETA NORMOLIPIDÊMICA

Quando os valores das variáveis estudadas do grupo de machos inoculados e tratados com dieta hiperlipidêmica foram comparados com o controle tratado com dieta normolipidêmica, tabela 6, foram significantemente maiores: altura da placa ateromatosa

(P=0,011); área da placa ateromatosa (P=0,002); área de gordura da placa (P=0,006); porcentagem de obstrução da luz (P=0,002), entre as inoculadas com *C.pneumoniae*.

Os inoculados com *M.pneumoniae* apresentaram os valores significantemente maiores para: altura da placa ateromatosa (P=0,016); área da placa ateromatosa (P=0,003); área de gordura da placa (P=0,011); porcentagem de obstrução da luz (P=0,002).

Para os inoculados com as duas bactérias, os valores maiores das variáveis foram para: altura da placa ateromatosa (P=0,026); área da placa ateromatosa (P=0,004); porcentagem de obstrução da luz (P<0,001).

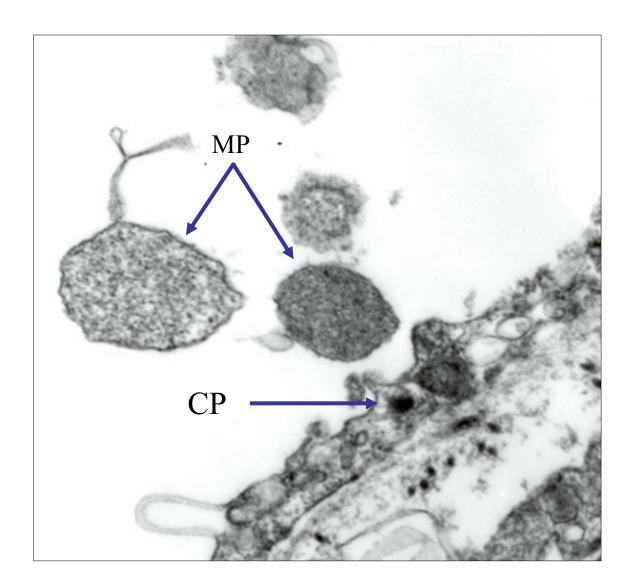


Figura 4. Representação de *C.pneumoniae* (CP) e *M.pneumoniae* (MP) ME 4.200 X

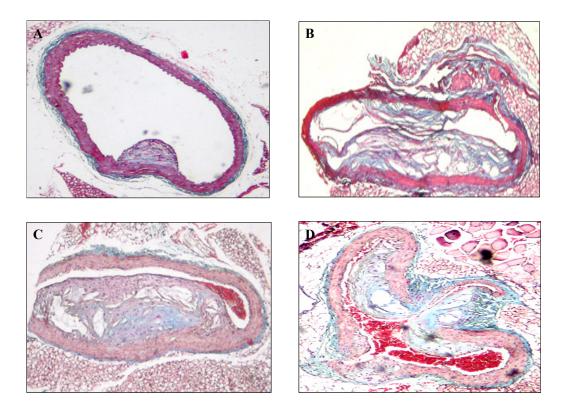


Figura 5. Aspectos microscópicos que exemplificam a aorta dos camundongos apoE KO dos diferentes grupos de fêmeas alimentadas com ração normolipidêmica. A – controle,
 B – inoculadas com *C.pneumoniae*, C – inoculadas com *M.pneumoniae*,
 D – inoculadas com *C.pneumoniae* e *M.pneumoniae*. Coloração por tricrômicro de Masson, 80X

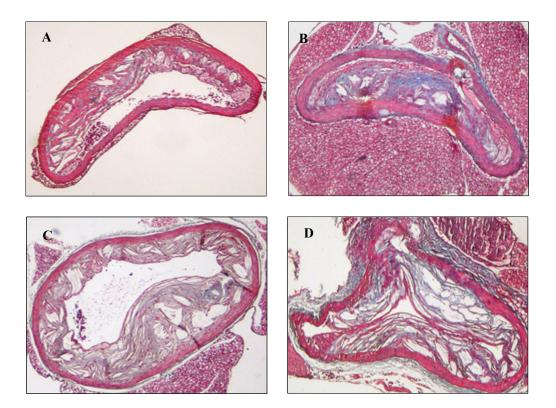


Figura 6. Aspectos microscópicos que exemplificam a aorta dos camundongos apoE KO dos diferentes grupos de fêmeas alimentadas com ração hiperlipidêmica. A – controle, B – inoculadas com *C.pneumoniae*, C – inoculadas com *M.pneumoniae*, D – inoculadas com *C.pneumoniae* e *M.pneumoniae*. Coloração por tricrômicro de Masson, 80X

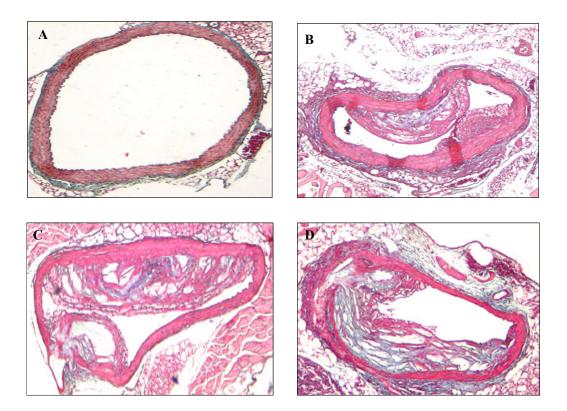


Figura 7. Aspectos microscópicos que exemplificam a aorta dos camundongos apoE KO dos diferentes grupos de machos alimentados com ração normolipidêmica. A – controle,
 B – inoculados com *C.pneumoniae*, C – inoculados com *M.pneumoniae*,
 D – inoculados com *C.pneumoniae* e *M.pneumoniae*. Coloração por tricrômicro de Masson, 80X

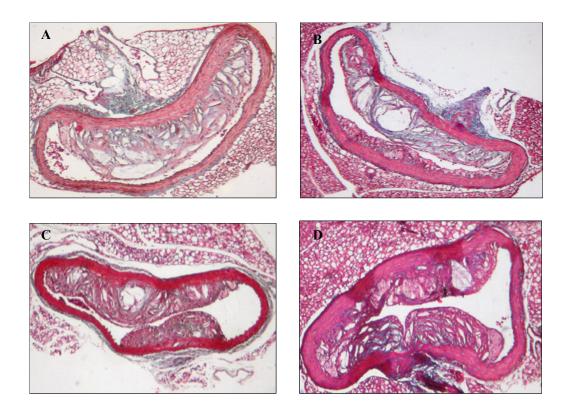


Figura 8. Aspectos microscópicos que exemplificam a aorta dos camundongos apoE KO dos diferentes grupos de machos alimentadas com ração hiperlipidêmica. A – controle, B – inoculados com *C.pneumoniae*, C – inoculados com *M.pneumoniae*, D – inoculados com *C.pneumoniae* e *M.pneumoniae*. Coloração por tricrômicro de Masson, 80X

Tabela 1-Valores das medianas (mínimo-máximo) das medidas morfométricas dos camundongos apoE KO, fêmeas, inoculadas com C. pneumoniae e/ou M. pneumoniae, alimentadas com dieta normolipidêmica, comparadas aos controles não inoculados, tratados com dieta normolipidêmica

Variáveis	Controle n=9	CP n=8	Ь	MP n=5	Ь	CPMP n=9	Ь
Altura da placa ateromatosa (μm)	0 0-125	183 75-327	0,002	98 65-413	0,109	112 0-329	0,030
Área da placa ateromatosa (mm²)	0 0.00-0,15	0,27 0,05-0,36	0,001	0,22 0,03-0,72	0,008	0,08	0,052
Área de gordura da placa ateromatosa (mm²)	0,00-0,01	0,03	0,002	0,052 0,01-0,15	0,008	0,005	0,170
Área da luz da artéria aorta (mm²)	0,40 0,27-1,03	0,77	0,268	1,33 0,74-2,64	0,033	0,38 0,12-1,05	0,536
Área da artéria aorta (mm²)	0,47	0,96	0,075	1,4 0,89-2,93	0,033	0,57	0,930
Porcentagem de obstrução da luz	0	24 10-38	<0,001	16	0,008	15	0,030

• P=probabilidade testada pelo Mann Whitney; n= tamanho da amostra; CP = C.pneumoniae; MP = M.pneumoniae

Tabela 2-Valores das medianas (mínimo-máximo) das medidas morfométricas dos camundongos apoE KO, fêmeas, inoculadas com Cpneumoniae e/ou M.pneumoniae, alimentadas com dieta hiperlipidêmica, comparadas aos controles não inoculados, tratados com dieta hiperlipidêmica

Altura da placa ateromatosa (μm) 173 232 0,3 0,340 80-322 0,322 0,14 0,26 0,16-0,64 0,000-0,27 0,16-0,64 0,000-0,05 0,000-0,05 0,014-0,80 0,51-1,76	0,265	240		n=8	ц
0,14 0,26 0,00-0,27 0,16-0,64 0,02 0,02 0,00-0,05 0,01-0,05 0,40 0,57 0,14-0,80 0,51-1,76	,023	118-461	0,218	252 184-675	0,043
0,02 0,02 0,00-0,05 0,01-0,05 0,40 0,57 0,14-0,80 0,51-1,76		0,23	0,075	0,26 0,14-0,75	0,023
0,40 0,57 0,14-0,80 0,51-1,76	0,433	0,04	0,095	0,04 0,01-0,12	0,035
	0,076	0,51 0,21-1,26	0,198	0,70 0,50-1,73	0,023
0,53 0,75 0,0 0,21-1,10 0,54-1,76	0,052	0,63 0,30-1,51	0,366	0,87 0,62-2,12	0,052
Porcentagem de obstrução da luz 30 44 0,((%) 0-50 21-57	0,063	36 21-76	0,286	33 16-93	0,160

* P=probabilidade testada pelo Mann Whitney; n= tamanho da amostra; CP = C. pneumoniae; MP = M. pneumoniae

Tabela 3-Valores das medianas (mínimo-máximo) das medidas morfométricas dos camundongos apoE KO, fêmeas, inoculadas com C.pneumoniae e/ou M.pneumoniae, alimentadas com dieta hiperpidêmica, comparadas aos controles não inoculados, tratados com dieta normolipidêmica

Ь	0,043	<0,001	<0,001	0,136	0,136	<0,001
CPMP n=9	252 184-675	0,26 0,14-0,75	0,04	0,70 0,50-1,73	0,87	33 16-93
Ь	0,002	0,003	0,002	0,777	0,659	0,004
MP n=12	240 118-461	0,23 0,05-0,44	0,04	0,51	0,63	36 21-76
А	0,002	<0.001	0,002	0,268	0,268	<0,001
CP n=8	232 80-322	0,26 0,16-0,64	0,02 0,01-0,05	0,57	0,75	44 21-57
d	0,012	0,015	0,012	0,821	1,00	0,011
Controle Hiper n=11	173 0-340	0,14 0,00-0,27	0,02 0,00-0,05	0,40	0,53 0,21-1,10	30
Controle Normo n=9	0 0-125	0,00-0,15	0,00-0,01	0,40	0,47	0 0-15
Variáveis	Altura da placa ateromatosa (μm)	Área da placa ateromatosa (mm²)	Área de gordura da placa ateromatosa (mm²)	Área da luz da artéria aorta (mm²)	Área da artéria aorta (mm²)	Porcentagem de obstrução da luz (%)

* P=probabilidade testada pelo Mann Whitney; n= tamanho da amostra; CP = C.pneumoniae; MP = M.pneumoniae

Tabela 4-Valores das medianas (mínimo-máximo) das medidas morfométricas dos camundongos apoE KO, machos, inoculados com Cpneumoniae e/ou M. pneumoniae, alimentados com dieta normolipidêmica, comparados aos controles não inoculados, tratados com dieta normolipidêmica

Variáveis	Controle n=6	CP n=8	Ь	MP n=8	Ь	CPMP n=10	d
Altura da placa ateromatosa (μm)	28 0-88	177 0-307	0,081	106 0-173	0,414	103 0-396	0,175
Área da placa ateromatosa (mm²)	0,006	0,16 0,00-0,26	0,013	0,04 0,00-0,18	0,282	0,12 0,00-0,48	0,029
Área de gordura da placa ateromatosa (mm²)	0,006	0,04	0,059	0,01	0,573	0,02	0,175
Área da luz da artéria aorta (μm^2)	0,45 0,23-0,75	0,41 0,15-1,73	1,000	0,43 0,26-1,48	0,662	0,63 0,31-1,58	0,255
Área da artéria aorta (mm²)	0,63 0,31-1,24	0,59	0,852	0,65 0,34-1,84	0,573	0,81 0,45-2,02	0,481
Porcentagem de obstrução da luz (%)	3	36 0-53	0,013	9	0,282	12 0-36	0,193

* P=probabilidade testada pelo Mann Whitney; n= tamanho da amostra; CP = C. pneumoniae; MP = M. pneumoniae

百百

Variáveis Controle CP P MP P CPMP P Altura da placa ateromatosa (µm²) 153 226 0,296 193 0,459 177 1,000 Área da placa ateromatosa (mm²) 0,14 0,18 0,244 0,15 0,459 0,15 0,945 Área da placa ateromatosa (mm²) 0,01-0,21 0,06-0,41 0,244 0,15 0,459 0,15 0,945 Área de gordura da placa ateromatosa (mm²) 0,00-0,21 0,08 0,044-0,36 0,169 0,01-0,10 1,000 Área de gordura da placa ateromatosa (mm²) 0,600,05 0,01-0,14 0,01-0,08 0,01-0,08 0,01-0,08 0,01-0,08 0,01-0,08 0,01-0,10 Área da luz da artéria aorta (mm²) 0,60 0,46 0,597 0,49-1,43 0,21-0,86 0,51-0,86 Área da artéria aorta (mm²) 0,70 0,60 0,60 0,832 0,772 0,459 0,51-0,86 Área da artéria aorta (mm²) 0,710-0,82 0,51-1,96 0,525 0,571 0,459 0,51-0,00 <th>C.pneumoniae e/ou M. pneumoniae, alimentados com dieta hiperlipidêmica, comparados aos controles não inoculados, tratados com dieta hiperlipidêmica</th> <th><i>eumoniae</i>, alime</th> <th>ntados com dieta</th> <th>a hiperlipidêm</th> <th>ica, comparados a</th> <th>aos controles</th> <th>s não inoculados</th> <th>s, tratados con</th>	C.pneumoniae e/ou M. pneumoniae, alimentados com dieta hiperlipidêmica, comparados aos controles não inoculados, tratados com dieta hiperlipidêmica	<i>eumoniae</i> , alime	ntados com dieta	a hiperlipidêm	ica, comparados a	aos controles	s não inoculados	s, tratados con
153 226 0,296 193 0,459 177 47-236 49-387 66-350 0,459 177 0,14 0,18 0,244 0,15 0,459 0,15 0,01-0,21 0,06-0,41 0,04-0,36 0,169 0,08-0,41 0,000,05 0,01-0,14 0,01-0,08 0,01-0,08 0,01-0,08 0,60 0,46 0,597 0,53 0,397 0,43 0,33-0,85 0,36-1,53 0,49-1,43 0,21-0,86 0,57 0,10-0,82 0,51-1,96 0,57-1,58 0,29-1,00 30 33 0,525 25 0,791 35 6-48 14-54 8-39 18-56 18-56	Variáveis	Controle n=7	CP n=9	Ь	MP n=9	Ь	CPMP n=6	Ь
$ \begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	Altura da placa ateromatosa (μm)	153 47-236	226 49-387	0,296	193 66-350	0,459	177	1,000
0,02 0,08 0,044 0,05 0,169 0,02 0,000,05 0,01-0,14 0,01-0,08 0,01-0,10 0,60 0,46 0,597 0,4397 0,43 0,33-0,85 0,36-1,53 0,49-1,43 0,21-0,86 0,72 0,60 0,832 0,72 0,459 0,57 0,10-0,82 0,51-1,96 0,57-1,58 0,57-1,00 0,29-1,00 30 33 0,525 25 0,791 35 6-48 14-54 8-39 18-56	Área da placa ateromatosa (mm²)	0,14 0,01-0,21	0,18 0,06-0,41	0,244	0,15 0,04-0,36	0,459	0,15 0,08-0,41	0,945
0,60 0,46 0,597 0,53 0,397 0,43 0,33-0,85 0,36-1,53 0,49-1,43 0,21-0,86 0,72 0,60 0,832 0,72 0,459 0,57 0,10-0,82 0,51-1,96 0,57-1,58 0,29-1,00 30 33 0,525 25 0,791 35 6-48 14-54 8-39 18-56	Área de gordura da placa ateromatosa (mm^2)	0,00	0,08	0,044	0,05	0,169	0,02 0,01-0,10	1,000
0,72 0,60 0,832 0,72 0,459 0,57 0,10-0,82 0,51-1,96 0,57-1,58 0,29-1,00 30 33 0,525 25 0,791 35 6-48 14-54 8-39 18-56	Área da luz da artéria aorta (mm^2)	0,60	0,46 0,36-1,53	0,597	0,53	0,397	0,43 0,21-0,86	0,628
30 33 0,525 25 0,791 35 6-48 14-54 8-39 18-56	Área da artéria aorta (mm²)	0,72 0,10-0,82	0,60 0,51-1,96	0,832	0,72 0,57-1,58	0,459	0,57 0,29-1,00	0,445
	Porcentagem de obstrução da luz (%)	30 6-48	33 14-54	0,525	25 8-39	0,791	35 18-56	0,366

* P=probabilidade testada pelo Mann Whitney; n=tamanho da amostra; CP = C.pneumoniae; MP = M.pneumoniae

Tabela 6-Valores das medianas (mínimo-máximo) das medidas morfométricas dos camundongos apoE KO, machos, inoculados com Cpneumoniae e/ou M. pneumoniae, alimentados com dieta hiperlipidêmica, comparados aos controles não inoculados, tratados com

Variáveis	Controle	Controle	Ь	CP	Ь	MP	Ь	CPMP	Ь
	Normo	Hiper		6=u		6=u		9=u	
	9=0	n=7							
Altura da placa	28	153	0,022	226	0,011	193	0,016	177	0,026
ateromatosa (µm)	0-88	47-236		49-387		66-350		106-613	
Área da placa	0,006	0,14	0,005	0,18	0,002	0,15	0,003	0,15	0,004
ateromatosa	0-0,05	0,01-0,21		0,06-0,41		0,04-0,36		0,08-0,41	
Área de gordura	0,006	0,02	0,073	0,08	90000	0,05	0,011	0,02	0,093
da placa	0-0,03	0,00-0,05		0,01-0,14		0,01-0,08		0,01-0,10	
Área da luz da	0,45	09'0	0,836	0,46	0,444	0,53	0,112	0,43	0,818
artéria aorta	0,23-1,02	0,33-0,85	,	0,36-1,53		0,49-1,43		0,21-0,86	
Área da artéria	0,63	0,72	0,731	09,0	0,444	0,72	0,316	0,57	0,699
aorta (mm²)	0,31-1,24	0,10-0,82	,	0,51-1,96		0,57-1,58		0,29-1,00	
Porcentagem de	3	30	0,002	33	0,002	25	0,002	35	<0,001
obstrucão da luz	90	818		11 51		0 30		10 56	

* P=probabilidade testada pelo Mann Whitney; n= tamanho da amostra; $CP = C_p$ meumoniae; $MP = M_p$ meumoniae

6 DISCUSSÃO

6.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE O DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O presente estudo teve como objetivo verificar se a infecção por *C.pneumoniae* e/ou *M.pneumoniae* em camundongos apoE KO afetaria a morfologia da placa ateromatosa, de acordo com o sexo e a dieta rica em colesterol. O estudo foi planejado contendo oito grupos. Os grupos infectados e tratados com dieta normolipidêmica foram comparados com o controle não infectado e tratados com a mesma dieta. Os outros grupos infectados e tratados com dieta hiperlipidêmica foram comparados com o controle não infectado e tratado também com dieta hiperlipidêmica. Como foram utilizados machos e fêmeas, os grupos experimentais foram comparados aos controles do mesmo sexo. Por meio desses grupos controles foi possível individualizar a suscetibilidade à infecção, ligada ao sexo. Também foram comparados os grupos infectados e tratados com dieta hiperlipidêmica com os grupos controles tratados com dieta normolipidêmica, possibilitando associar o efeito da infecção e da dieta com as alterações morfológicas das placas ateromatosas.

Quanto ao modelo animal, os camundongos apoE KO são freqüentemente utilizados para estudos de patogênese, imunologia, evolução da infecção e terapia de aterosclerose (de KRUIF et al., 2005). A escolha deste modelo biológico possibilitou a descontaminação sanitária, uma vez que havia necessidade de utilizar-se animais livres da infecção por micoplasmas e clamídias. Assim, o procedimento de histerectomia asséptica, a manutenção dos reprodutores no interior de isoladores e a posterior manipulação dos filhotes desmamados, no interior de micro-isoladores, foram importantes para a manutenção do estado sanitário, principalmente pelo período de experimentação ter sido longo: os camundongos foram tratados com colesterol a partir dos 2 meses de idade, receberam a

primeira infecção aos 8 meses, a segunda infecção aos 9 e foram sacrificados com 10 meses de idade, aproximadamente.

A certificação sanitária dos animais mantidos no interior de isoladores foi satisfatória quanto à ausência de bactérias patogênicas, comprovada por coleta de espécimes e inoculação em meios específicos de uma amostragem de animais, mas os resultados, quando analisados por testes sorológicos, não foram conclusivos (resultados não apresentados).

As doses infectantes e o número de inoculações foram baseados em estudos prévios, empregando o mesmo modelo biológico, que mostraram que repetidas inoculações com *C.pneumoniae* levam a uma disfunção do endotélio na aorta (MOAZED et al., 1999; BURNETT et al., 2001; ROTHSTEIN et al., 2001). Quanto ao *M.pneumoniae*, não há relatos prévios da inoculação deste organismo em estudos de aterogênese em camundongos apoE KO, optando-se pela utilização de dose e repetições semelhantes às utilizadas nos estudos com *C.pneumoniae*, devido serem ambas bactérias transmitidas naturalmente por aerossóis e os indivíduos estarem sujeitos a inúmeras re-infecções.

A escolha do arco aórtico dos camundongos foi determinada por ser neste segmento que ocorre a maior incidência de formação de placa ateromatosa. O corte histológico foi analisado de maneira a englobar todas as estruturas da artéria, ou seja, o perímetro externo correspondente a lâmina elástica externa; o perímetro interno correspondente a lâmina elástica interna; a área da placa ateromatosa; a área de gordura da placa ateromatosa; a altura da placa; os diâmetros da artéria e da luz da artéria.

A área da artéria foi calculada a partir do perímetro, supondo corresponder a uma secção transversal do vaso, portanto, representando uma circunferência. Como havia a possibilidade do vaso ter sido representado na lâmina obliquamente, foram medidos: o diâmetro da artéria correspondente à distância representada entre as lâminas elásticas externas e o diâmetro da luz, correspondente à distância representada entre as lâminas elásticas

internas. Desta forma, os cálculos das porcentagens de obstrução da luz, ou seja, o quanto a placa ateromatosa poderia estar ocluindo o lúmen, foram realizados utilizando como parâmetros tanto a área da artéria quanto o diâmetro da mesma, havendo coincidência dos mesmos. Nas tabelas foram representados os cálculos obtidos a partir do perímetro da artéria.

Como neste estudo o enfoque foi histopatológico, utilizou-se as técnicas tradicionais para cortes de tecido incluído em parafina, já tradicionalmente padronizadas para diagnóstico anátomo-patológico. A análise morfométrica dos cortes histológicos foi utilizada pelo fato de fornecer dados precisos e objetivos (COLLAN, 1984). A coloração pelo tricrômico de Masson contribuiu para uma melhor avaliação das áreas de fibrose e gordura.

6.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE OS RESULTADOS

A infecção por *C.pneumoniae* e/ou *M.pneumoniae* causou agravamento da aterosclerose tanto nos machos quanto nas fêmeas. A análise comparativa entre a suscetibilidade à infecção, o sexo e a dieta, permitiu inferir qual variável poderia produzir placas ateromatosas com características de estabilidade ou instabilidade, parâmetros importantes no diagnóstico precoce de eventos agudos da aterosclerose nos seres humanos.

6.3 ATEROSCLEROSE E A INFECÇÃO

Os resultados da infecção por *C.pneumoniae* no presente estudo confirmam o papel desta bactéria na exacerbação da intensidade de placa ateromatosa, tanto nos machos quanto nas fêmeas, porém com maior ênfase nas fêmeas não suplementadas com colesterol, quando

comparadas ao controle constituído por fêmeas normolipidêmicas. Quando a análise associou a presença da bactéria com o excesso de colesterol na dieta, mais uma vez houve exacerbação nos dois sexos, visualizado pela comparação com o controle normolipidêmico de cada sexo. Estes resultados estão de acordo com os observados por HU; PIERCE; ZHONG, 1999; LIU et al., 2000; MOAZED et al., 1999, em camundongos, infectados com *C.pneumoniae* e também tratados com dieta hiperlipidêmica. Outros autores não confirmaram o envolvimento da bactéria no agravamento da aterosclerose (AALTO-SETALA et al, 2001; BLESSING et al., 2000; CALIGIURI et al., 2001; LIUBA et al, 2000; PISLARU; VAN DER WERFER, 2003).

Quanto à infecção por M.pneumoniae não há relatos na literatura sobre o efeito desta bactéria na aterosclerose no mesmo modelo biológico aqui utilizado. Em seres humanos, a hipótese de que a co-infecção de micoplasma e clamídia estaria associada à aterosclerose foi descrita por Higuchi e colaboradores, examinando, ao microscópio eletrônico, segmentos coronarianos contendo placas estáveis e rotas dos mesmos pacientes. Em trabalhos subsequentes, do mesmo grupo de pesquisadores, verificaram que a associação de C.pneumoniae e M.pneumoniae aumenta a virulência e a proliferação da clamídia, inflamação da placa e possível ruptura. Fong et al (1999) analisando a infecção de somente M.pneumoniae em coelhos, observaram que não há produção de aterosclerose. Momyiama et al. (2004), em estudo envolvendo 549 pacientes, verificaram que os anticorpos contra M.pneumoniae estavam associados à doença coronariana crônica, porém, esta associação era restrita à pacientes soropositivos para C.pneumoniae, levando este grupo de pesquisadores a concluir que a co-infecção por M.pneumoniae e C.pneumoniae poderia ser um importante fator na doença coronariana crônica. Portanto, os resultados apresentados pelos estudos da literatura corroboram os observados neste estudo quando a presença das duas bactérias exacerbou a aterosclerose, principalmente nas fêmeas hiperlipidêmicas.

6.4 A VULNERABILIDADE DAS PLACAS ATEROMATOSAS ASSOCIADAS À INFECÇÃO E AO SEXO

Avaliando se o tipo de infecção e o sexo alterariam as características de vulnerabilidade da placa aterosclerótica, observou-se que dieta normal produziu nas fêmeas inoculadas com *M.pneumoniae* placas instáveis, com maior conteúdo de gordura e remodelamento positivo. Estas características de instabilidade de placas também foram observadas entre as fêmeas infectadas com as duas bactérias e tratadas com dieta hiperlipidêmica.

A importância da avaliação deste parâmetro de vulnerabilidade deve-se ao fato que estudos angiográficos em seres humanos revelaram que a erosão ou ruptura ocorria freqüentemente em placas com capa fibrosa fina e lúmen preservado da artéria, caracterizando um remodelamento positivo (AMBROSE et al., 1988; DAVIES; THOMAS, 1985; HACKETT; DAVIES; MASERI, 1988). Estas placas vulneráveis contêm grande quantidade de lipídeos (DAVIES et al., 1993) e de macrófagos (MORENO; FALK; PALACIOS, 1994; van der WAL et al., 1994). O acúmulo de macrófagos aumenta a quantidade de citocinas próinflamatórias e enzimas degradadoras de matriz extracelular (LIBBY, 1995; VIEIRA; RAMIRES, 2003). Os microvasos dentro da placa têm papel importante na sua ruptura, por proporcionarem uma extensa superfície de endotélio ativado que recruta células inflamatórias e promovem hemorragia intraplaca (O'BRIEN et al., 1993).

Bezerra et al. (2001) observaram em segmentos coronarianos humanos de pacientes que foram a óbito que onde havia um aumento da área de espessamento da íntima, havia uma altura maior da placa, levando a um afilamento das camadas externas do vaso e permitindo a protrusão da placa, afastando-a do centro do lúmen, sendo esse fenômeno concentrado no local de maior altura da mesma, devido a maior concentração de macrófagos produtores de

metaloproteinases degradadoras da matriz extracelular, o que poderia estar favorecendo a expansão da artéria no local de maior concentração destas células.

As placas ateromatosas que apresentam predominância de matriz extracelular, menor quantidade de lipídeos e infiltrado inflamatório, porém maior obstrução do lúmen da artéria, portanto, um remodelamento negativo, são menos passíveis de sofrerem ruptura. A coinfecção por *C.pneumoniae* e *M.pneumoniae* produziu placas mais estáveis, sem remodelamento positivo e menor conteúdo em gordura, tanto em machos quanto em fêmeas, alimentados com dieta normolipidêmica.

Esta estabilidade das placas ateroscleróticas está associada a presença de fatores de crescimento que favorecem um acúmulo de células musculares lisas e aumento da capa fibrótica. Os vasos normais geralmente expressam pouco ou indetectáveis concentrações de PDGF (NICHOLSON; GAN; HAIER, 2003), que parecem ter papel fundamental na proliferação de células musculares lisas, importantes componentes na formação da capa fibrótica e estabilização da placa (BEZERRA et al., 2001; SHOR; PHILLIPS, 1999). A inibição de fator de crescimento endotelial e de PDGF leva a diminuição da proliferação de células musculares lisas e inflamação em artérias coronarianas implantadas em ratos (NYKANEN et al., 2005).

Os micoplasmas são considerados oportunistas podendo, entretanto, provocarem uma alteração nas respostas imunes (KRAUSSE-OPATZ et al., 2004), ativando receptores importantes para tais respostas, induzindo apoptose em linfócitos e monócitos (INTO et al., 2002; ROTTEM, 2003). Quando associados a outras bactérias, os micoplasmas provocam doenças crônicas (NICHOLSON; GAN; HAIER, 2003) e in vitro podem inibir a proliferação de clamídias (van NEROM et al., 2000).

No presente estudo, os resultados parecem corroborar as observações de Higuchi et al (2006) e de Prochnau et al (2004) de que a clamídia estaria mais associada a fatores de inflamação da placa e a instabilidade, enquanto o micoplasma, a todos os tipos de placas.

A hipótese que a infecção por múltiplos patógenos poderia aumentar substancialmente o risco de disfunção do endotélio arterial e alcançar um limiar para indução de alterações ateroscleróticas, atraiu a atenção de alguns pesquisadores.

Liuba et al. (2003) relataram que a co-infecção de camundongos apoE KO com *C.pneumoniae* e *H.pylori* resultou em disfunção endotelial aórtica e aumento da expressão de moléculas de adesão pró-inflamatórias. Outro estudo em seres humanos com doença coronariana, demonstrou o risco para disfunção endotelial associado ao aumento do número de patógenos (PRASAD et al., 2002).

A infecção bacteriana associada a patofisiologia de doença coronariana foi discutida por Ott et al. (2005) em estudo constituído por 38 indivíduos portadores da doença e retirando destes pacientes tecidos obtidos de aterectomia, com catéter. Os tecidos foram submetidos à hibridização in situ para detecção de DNA bacteriano. Foi observada uma grande diversidade de espécies bacterianas em todos os espécimes, sugerindo que a colonização por diversas bactérias seria mais importante do que por uma única espécie. Suas observações não permitiram concluir que as bactérias fossem os agentes causadores da etiopatogenia da doença coronariana crônica. Todavia, agentes bacterianos poderiam colonizar secundariamente lesões ateromatosas e atuar como fator adicional, acelerando a progressão da doença.

Lehtieniemi et al. (2005) sugeriram que ateromas poderiam atuar como peneiras mecânicas coletando bactérias da circulação, atribuindo aos microorganismos o papel de inocente espectador. Embora o conceito da superfície coronária atuar como peneira seja intrigante, a colonização bacteriana resultante das lesões poderia ainda direcionar o processo de inflamação local (OTT et al., 2005). A presença de macrófagos locais e ativação dos

monócitos sistêmicos (DORFFEL et al, 1999; HANSSON, 2005), confirmam esta hipótese. Por outro lado, a infecção primária de placas poderia ser um processo não específico, acelerando a progressão da doença (OTT et al., 2005).

Outra possível explicação para a presença de grande variedade de DNA bacteriano na coronária seria pela translocação de bactérias do trato gastrontestinal, especialmente da cavidade oral. A incidência de bacteremia após extração dentária, tratamento endodôntico ou periodontal, com migração via raiz, está bem documentada (LI et al., 2000).

6.5 MECANISMOS DE AÇÃO DOS AGENTES INFECCIOSOS

A infecção pode influenciar o desenvolvimento da aterosclerose por inúmeros mecanismos, dentre os quais: a disseminação dos microorganismos ou de seus componentes para dentro da parede arterial e pelas elevadas concentrações de mediadores inflamatórios (STENVINKEL; HEIMBURGER; JOGESTRAND, 2002).

A influência na progressão da aterosclerose pode ser também pelas repetidas infecções durante a vida, levando a episódios de lesões arteriais transitórias, as quais somente se resolvem incompletamente após a cessação da doença. Esta hipótese é confirmada por estudos angiográficos (BRUSCHKE et al., 1989) que mostram que o curso natural da aterosclerose segue em degraus, com possíveis períodos de progressão e regressão da lesão (LIUBA; PESONEN, 2005).

Outros mecanismos que poderiam intervir na aterogênese são: a lesão arterial provocada por endotoxina lipopolissacarídea, liberada por bactérias gram negativas como *E.coli, C.pneumonieae e H.py*lori foi descrita (LIAO, 1996); a participação de autoimunidade devido a mimetização molecular entre o agente infeccioso e as proteínas

endovasculares, tais como Heat Shock Protein (LIBBY et al, 2002). Sendo também as clamídias ricas em Heat Shock Protein poderiam atuar por este mecanismo (KALAYOUGLU et al., 2000).

A aterogênese pode também ser agravada pela diminuição da concentração plasmática de HDL durante uma infecção aguda e crônica (KHOVIDHUNKIT et al., 2004), por ser esta lipoproteína importante no transporte reverso de colesterol, retirada de produtos oxidados e mediadores inflamatórios da circulação.

A infecção e a inflamação podem também amplificar as modificações oxidativas de LDL (KHOVIDHUNKIT et al., 2004). Esta oxidação de LDL leva a formação de produtos que exercem inúmeros efeitos aterogênicos, incluindo expressão de moléculas de adesão pró-inflamatórias na superfície endotelial, indução de proteínas quimio-atractantes de monócitos e linfócitos, proliferação de células musculares lisas e formação de células xantomatosas (KITA et al., 2001). A LDL oxidada pode estimular a indução do gene de proteínas pró-inflamatórias, fator nuclear kappa, o evento chave para patogênese da aterosclerose. O englobamento de LDL oxidada por macrófago, via receptores, leva a transformação desta célula para célula xantomatosa, outro fator importante na aterogênese (LIUBA; PESONEN, 2005).

Da mesma forma, foi demonstrado que certos patógenos podem infectar as células endoteliais, aumentando a expressão de moléculas de adesão e proteínas quimio-atractantes, e a síntese de citocinas pró-inflamatórias (VITA; LOSCALZO, 2002). As células endoteliais infectadas podem responder aumentando a síntese de trombina e expressão de Heat Shock Protein, que mimetizam os antígenos bacterianos, facilitando as reações auto-imunes (LIUBA; PESONEN, 2005).

6.6 ATEROSCLEROSE, SEXO E IDADE

No homem a aterosclerose se agrava anos após seu início. Em estudos com animais, utilizando vários modelos biológicos incluindo coelhos e camundongos modificados geneticamente, os efeitos da inoculação de bactérias sobre a progressão da aterosclerose foi mais acentuado em animais jovens, e correlacionou-se com o número de inoculação (MOAZED et al., 1999). Outros estudos relataram o agravamento das placas ateromatosas na artéria braquiocefálica em camundongos com mais de 50 semanas de idade (ROSENFELD et al., 2000).

Neste estudo, os camundongos apoE KO foram sacrificados com 10 meses de idade e a infecção foi provocada no oitavo mês, sendo que neste período a aterosclerose já estava em evolução, uma vez que a introdução da dieta rica em colesterol se deu aos dois meses de idade. Nos resultados observados, as fêmeas apresentaram uma maior suscetibilidade ao aumento da aterosclerose. Diferença na suscetibilidade relacionada ao sexo foi anteriormente descrita (PAIGEN et al., 1987; WARDEN et al., 1993; van REE et al., 1994). A ausência do gene que codifica a apolipoproteína ApoE provoca um transtorno no metabolismo dos lipídeos destes camundongos, provocando um aumento da concentração de colesterol no soro, principalmente devido ao aumento das frações VLDL e LDL. Nos estudos de PAIGEN et al, 1987, as fêmeas apresentaram maiores concentrações das frações de VLDL e LDL e menores concentrações da fração HDL, justificando assim a maior suscetibilidade a aterosclerose nelas observada.

A diminuição da concentração da fração de lipoproteína HDL nas fêmeas, também foi verificada no soro dos camundongos estudados (dados não apresentados), o que sugere a associação desta lipoproteína com o agente infeccioso, exacerbando a aterosclerose.

6.7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As contradições encontradas na literatura com relação ao papel de agentes infecciosos no agravamento da aterosclerose se devem a várias causas, como o potencial aterogênico das infecções estar na dependência de outros fatores de risco, com os quais as infecções atuam sinergisticamente. Esta hipótese está de acordo com a etiologia multifatorial da aterosclerose, além da possibilidade do agente infeccioso não ser mais detectável em estágios avançados da aterosclerose (LIUBA; PESONEN, 2005).

Quase um século se passou desde as primeiras suspeitas de que agentes infecciosos poderiam agravar a aterosclerose, agentes estes que, naquela época, eram a principal causa da mortalidade em seres humanos. Desde então, o panorama se modificou. Atualmente a principal causa da mortalidade é a aterosclerose. Se a hipótese de que agentes infecciosos estão implicados no agravamento da doença for verdadeira, seria verdadeiro também afirmar que a principal causa da mortalidade no homem continua sendo infecciosa.

O delineamento experimental proposto neste estudo foi capaz de detectar e quantificar alterações presentes na espessura da íntima, estenose do lúmen e remodelamento da aorta de camundongos, confirmando a associação de agentes infecciosos com o agravamento da aterosclerose. A simplicidade do modelo permite a continuidade da sua utilização para aprofundamento nos estudos da interação entre as bactérias e as células presentes no ateroma. Permite também a sua utilização no estudo da ação de drogas sobre redução da aterosclerose e inúmeras outras abordagens.

Os resultados confirmam estudos prévios envolvendo agentes infecciosos na patogênese da aterosclerose, mas pesquisas utilizando métodos quantitativos para detecção de antígenos e de DNA, são necessárias para um aprofundamento do assunto.

7 CONCLUSÃO

Pode-se concluir com os resultados do presente estudo que, em camundongos apoE KO:

- 1. A infecção por *C.pneumoniae* e/ou *M.pneumoniae* induziu ou causou agravamento da aterosclerose, tanto em machos quanto em fêmeas.
- 2. Houve diferenças nas características de vulnerabilidade da placa aterosclerótica, conforme o tipo de agente infeccioso e o sexo.
- 3. A dieta normolipidêmica produziu placas com as seguintes características:
 - a) Mais instáveis, com maior conteúdo de gordura e remodelamento positivo, nas fêmeas, mas não nos machos, infectadas por *M.pneumoniae*.
 - b) Mais estáveis, com menor conteúdo de gordura e sem remodelamento, tanto nos machos quanto nas fêmeas, co-infectados por *C.pneumoniae* e *M.pneumoniae*.
- 4. A introdução de colesterol levou às seguintes mudanças:
 - Não houve remodelamento positivo do vaso com infecção por M.pneumoniae nas fêmeas.
 - b) Desenvolvimento de placas mais instáveis, mais volumosas, com maior conteúdo de gordura e com remodelamento positivo, nas fêmeas, mas não nos machos, co-infectados por *M.pneumoniae* e *C.pneumoniae*.
 - c) Placas mais gordurosas nos machos infectados por *C.pneumoniae*.

REFERÊNCIAS

AALTO-SETALA, K.; LAITINEN, K.; ERKKILA, L.; LEINONEN, M.; JAUHIAINEN, M.; EHNHOLM, C.; TAMMINEN, M.; PUOLAKKAINEN, M.; PENTTILA, I.; SAIKKU, P. *Chlamydia pneumoniae* does not increase atherosclerosis in the aortic root of apolipoprotein E deficient mice. **Arter Thromb Vasc Biol**, v. 21, p. 578-584, 2001.

ABIFADEL, M.; VARRET, M.; RABES, J. P.; OUGUERRAM, K.; DEVILLERS, M.; CRUAUD, C.; BENJANNET, S.; WICKHAM, L.; ERLICH, D.; DERRE, A.; VILLEGER, L.; FARNIER, M.; BEUCLER, I.; BRUCKERT, E.; CHAMBAZ, J.; CHANU, B.; LECERF, J. M.; LUC, G.; MOULIN, P.; WEISSENBACH, J.; PRAT, A.; KREMPF, M.; JUNIEM, C.; SEIDAH, N. G.; BOILEAU, C. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. **Nat Genet**, v. 34, p. 154-156, 2003.

ACTON, S.; RIGOTTI, A.; LANDSCHULTZ, K. T.; XU, S.; HOBBS, H. H., KRIEGER, M. Identification of scavenger receptor SR-BI in a high density lipoprotein receptor. **Science**, v. 271, p. 460-461, 1996.

AIKAWA, M.; KIM, H. S.; KURO-O, M.; MANABE, I.; WATANABE, M.; YAMAGUCHI, H.; YAZAKI, Y.; NAGAI, R. Phenotyic modulation of smooth muscle cells during progression of human atherosclerosis as determined by altered expression of myosin heavy chain isoforms. **Ann N Y Acad Sci**, v. 748, p. 578-585, 1995.

AIKAWA, M.; RABKIN, E.; SUGIYAMA, S.; VOGLIC, S. J.; FUKUMOTO, Y.; FURUKAWA, Y.; SHIOMI, M.; SCHOEN, F. J.; LIBBY, P. An HMG-CoA reductase inhibitor, cerivastatin, suppresses growth of macrophages expressing matrix metalloproteinases and tissue factor in vivo and in vitro. **Circulation**, v. 103, n. 2, p. 276-283, 2001.

ALMAGOR, M.; KAHANE, I.; GILON, C.; YATZIV, S. Protective effects of the glutathione redox cycle and vitamin E on cultured fibroblasts infected by *Mycoplasma pneumoniae*. **Infect Immun**, v. 52, n. 1, p. 240-244, 1986.

AMBROSE, J. A.; TANNENBAUM, M. A.; ALEXOPOULOS, D.; HJEMDAHL-MONSEN, C. E.; LEAVY, J.; WEISS, M.; BORRICO, S.; GORLIN, R.; FUSTER, V. Angiographic progression of coronary artery disease and development of myocardial infarction. **J Am Coll Cardiol**, v. 12, n. 1, p. 56-62, 1988.

AMANN, K.; RITZ, C.; ADAMCZAK, M.; RITZ, E. Why is coronary heart disease of uraemic patients so frequent and so devastating? **Nephr Dial Transp**, v. 18, p. 631-640, 2003.

- AMENTO, E. P.; EHSANI, N.; PALMER, H.; LIBBY, P. Cytokines positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells. **Arter Thromb**, v. 11, n. 5, p. 1223-1230, 1991.
- ANNEX, B. H.; DENNING, S. M.; CHANNOM, K. M.; SKETCH, M. H.; STACK, R. S.; MORRISSEY, J. H.; PETERS, K.G. Differential expression of tissue factor protein in directional atherectomy specimens from patients with stable and unstable coronary syndromes. **Circulation**, v. 91, p. 619-611, 1995.
- ARBUSTINI, E.; DAL BELLO, B.; MORBINI, P.; BURKE, A. P.; BOCCIARELLI, M.; SPECCHIA, G.; VIRMANI, R. Plaque erosion is a major substrate for coronary thrombosis in acute myocardial infarction. **Heart**, v. 82, p. 269-272, 1999.
- ARMSTRONG, M. L.; HEISTAD, D. D. Animal models of atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v. 85, p. 15-23, 1990.
- BECK, J. D.; EKE, P.; HEISS, G.; MADIANOS, P.; COUPER, D.; LIN, D.; MOSS, K.; ELTER, J.; OFFENBACHER, S. Periodontal disease and cardiovascular disease. **Circulation**, v. 112, n. 1, p. 19-24, 2005.
- BERLINER, J. A.; NAVAB, M.; FOGELMAN, A. M.; FRANK, J. S.; DEMER, L. L.; EDWARDS, P. A.; WATSON, A. D.; LUSIS, A. J. Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation and genetics. **Circulation**, v. 91, n. 9, p. 2488-2496, 1995.
- BEZERRA, H. G.; HIGUCHI, M. L.; GUTIERREZ, P. S.; PALOMINO, S. A.; SILVESTRE, J. M. L. C.; LIBBY, P.; RAMIRES, J. A. F. Atheromas that cause fatal thrombosis are usually larger and frequently accompanied by vessel enlargement. **Cardiov Pathol**, v. 10, p. 189-196, 2001.
- BLESSING, E.; CAMPBELL, L. A.; ROSENFELD, M.E.; CLOUGH, N.; KUO, C.C. *Chlamydia pneumoniae* infection accelerates hyperlipidemia induced atherosclerotic lesion development in C57BL/6J mice. **Atherosclerosis**, v. 158, p. 13-17, 2001.
- BLOCK, S.; HEDRICK, J.; HAMMERSCHLAG, A. R.; CASSEL, G. H.; CRAFT, J. C. *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* in pediatric community-acquired pneumonia: comparative safety and efficacy of charithromycin vs. erythromycin. **Pediatr Infect Dis**, v. 14, p. 471-477, 1995.
- BORING, L.; GOSLING, J.; CLEARY, M.; CHARO, I. F. Decreased lesion formation in CCR2-/- mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. **Nature**, v. 394, p. 894-897, 1998.
- BROWN, A. S.; DAVIS, J. M.; MURPHY, E. A.; CARMICHAEL, M. D.; GHAFFAR, A.; MAYER, E. P. Gender differences in viral infection after repeated exercise stress. **Med Sci Sports Exerc**, v. 36, n. 8, p.1290-1295, 2004.

- BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. **Science**, v. 232, p. 34-47, 1986.
- BRUSCHKE, A.; KRAMER JR., J.; BAL, E.; HAQUE, I.; DETRANO, R.; GOORMASTIC, M. The dynamic of progression of coronary atherosclerosis studied in 168 medically treated patients who underwent coronary arteriography three times. **Am Heart J**, v. 117, p. 296-305, 1989.
- BURIAN, K.; BERENCSI, K.; ENDRESZ, V.; GYULAI, Z.; VAIVI-NAGY, I.; BAKAY, M., GENG, Y.; VIROK, D.; KARI, L.; HAINAL-PAPP, R.; TRINCHIERI; G.; GONCZOL, E. *Chlamydia pneumoniae* exacerbates aortic inflammatory foci caused by murine cytomegalovirus infection in normocholesterolemic mice. **Clin Diagn Lab Immun**, v. 8, n.6, p. 1263-1266, 2001.
- BURKE, A. P.; FARB, A.; MALCOM, G. T.; LIANG, Y.; SMIALEK, J.; VIRMANI, R. Effect of risk factors on the mechanism of acute thrombosis and sudden coronary death in women. **Circulation**, v. 97, p. 2110-2116, 1998.
- BURNETT, M. S.; GAYDOS, C. A.; MADICO, G. E.; GLAD, S. M.; PAIGEN, B.; QUINN, T. C.; EPSTEIN, S. E. Atherosclerosis in apoE knockout mice infected with multiple pathogens. **J Inf Dis**, v. 183, p. 226-321, 2001.
- CALIGIURI, G.; ROTTENBERG, M.; NICOLETTI, A.; WIGZELL, H.; HANSSON, G. K. *Chlamyidia pneumoniae* infection does not induce or modify atherosclerosis in mice. **Circulation**, v. 103, p. 2834-2838, 2001.
- CASSEL, G. H. Infectious causes of chronic inflammatory diseases and cancer. **Emerg Infect Dis**, v. 4, n. 3, p. 475-487, 1998.
- CASSEL, G. H.; CLYDE, W. A.; DAVIS, J. K. Mycoplasmal respiratory infections. In: RAZIN S, TULLY JG (Ed.). **The mycoplasmas**. New York: Academic Press, 1985. p. 66-105.
- CASSEL, G. H.; DRNEC, J.; WAITES, K. B. Efficacy of clarithromycin against *Mycoplasma pneumoniae*. **J Antimicrob Chemother**, v. 27, p. 47-59, 1991.
- CASSEL, G. H.; LINDSEY, J. R.; BAKER, H. J.. Mycoplasmal and rickettsial diseases. In: BAKER, H. J.; LINDSEY, J. R.; WEISBROTH, S. H. (Ed.). **The laboratory rat**. New York: Academic Press, 1979. v. 1, p. 243-69.
- CASSEL, G. H.; LINDSEY, J. R.; OVERCASH, R. G. Murine mycoplasma respiratory disease. **Ann N Y Acad Sci**, v. 225, p. 395-412, 1973.
- CASTELL, J. V.; GOMEZ-LECHON, M. J.; DAVID, M.; FABRA, R.; TRULLENGUE, R.; HEINRICH, P. C. Acute-phase response of human hepatocytes reulation of acute-phase protein synthesis by interleukin-6. **Hepatology**, v. 12, n. 5, p. 1179-1186, 1990.

- CASTRO, I.; BATLOUNI, M.; CANTARELLI, E.; RAMIRES, J. A. F.; LUNA, R. L.; FEITOSA, G. S. Circulação sanguínea. In: CASTRO, I. (Ed.). Cardiologia. Princípios e prática. Porto Alegre: Editora Artmed, 1999. p. 358-371.
- CHAMBLESS, L. E.; HEISS, G.; FOLSOM, A. R.; ROSAMOND, W.; SZKLO, M.; SHARRET, A. R.; CLEGG, L. X. Association of coronary heart disease incidence with carotid arterial wall thickness and major risk factors: the Atherosclerosis Risk in Coronaries (ARIC) Study, 1987-1993. **Am J Epidemiol**, v. 146, n. 6, p. 483-494, 1997.
- CLARKSON, T. B.; PRICHARD, R. W.; NETSKY, M. G. Ahterosclerosis in pigeons: its spontaneous occurrence and resemblance to human atherosclerosis. **AMA Arch Pathol**, v. 68, p. 143-147, 1959.
- COLLAN Y. Morphometry in pathology: another look at diagnostic histopathology. **Path Res Pract**, v. 179, p. 189-192, 1984.
- COLLINS, T.; CYBULSKY, M. I. NF Kappa B: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis? **J Clin Invest**, v. 107, p. 255-64, 2001.
- CORSARO, D.; VALASSINA, M.; VENDITTI, D.; VENARD, V.; LE FAOU, A.; VALENSIN, P. E. Multiplex PCR for rapid and differential diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* in respiratory infections. **Diag Microb Infect Dis**, v. 35, p. 105-108, 1999.
- COTRAN, K. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. **Patologia estrutural e funcional**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara-Koogan, 1989, p.458-470.
- CYBULSKY, M. I.; LIYAMA, K.; LI, H.; CHEN, M.; LIYAMA, M.; DAVIS, V.; GUTIERREZ-RAMOS, J. C.; CONNELLY, P. W.; MILSTONE, D. S. A major role for VCAM-1 but not ICAM-1, in early atherosclerosis. **J Clin Invest**, v. 107, p. 1255-1262, 2001.
- DAMY, S. B.; HIGUCH, M. L.; TIMENETSKY, J.; SAMBIASE, N. V.; REIS, M. M.; ORTIZ, S. C. B. C. Coinfection of laboratory rats with *Mycoplasma pulmonis* and *Chlamydia pneumoniae*. **Contemp Topics**, v. 42, n. 1, p. 52-56, 2003.
- DAMASCENO, N. R. T. Influência da proteína isolada da soja e da caseína no desenvolvimento da aterosclerose experimental em coelhos, induzida pela dieta rica em colesterol. 1997, 102 p. Tese (Mestrado).
- DANESH, J.; COLLINS, R.; PETO, R. Chronic infections and coronary heart disease: is there a link? **Lancet**, v. 350, p. 430-436, 1997.
- DAVIES, M. J.; GORDON, J. L.; GEARING, A.J. The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-selectin in human atherosclerosis. **J Pathol**, v. 171, p. 223-229, 1993.

- DAVIES, M. J.; THOMAS, A. C. Plaque fissuring the cause of acute myocardial infarction, sudden ischaemic death. **Br Heart J**, v. 53, p. 363-73, 1985.
- De KRUIF, M.; van GORP, E. C. M.; KELLER, T. T.; OSSEWAARDE, J. M.; ten CATE, H. *Chlamydia pneumoniae* infections in mouse models: relevance for atherosclerosis research. **Cardiova Res**, v.65, p.317-327, 2004.
- DEWOOD, M. A.; SPORES, J.; NOTSKE, R.; MOUSER, L. T.; BURROUGHS, R.; GOLDEN, M. S.; LANG, H. T. Prevalence of total coronary occlusion during the early hours of transmural myocradial infarction. **N Engl J Med**, v. 303, n. 16, p. 897-902, 1980.
- DOLLERY, C. M.; McEWAN, J. R.; HENNEX, A. M. Matrix metalloproteinases and cardiovascular diseases. **Circ Res**, v.77, n.5, p. 863-868, 1995.
- DORFFEL, Y.; LATSCH, C.; STUHLMULLER, B.; SCHREIBER, S.; SCHOLZE, S.; BURMESTER, G. R.; SCHOLZE, J. Preactivated peripheral blood monocytes in patients with essencial hypertension. **Hypertension**, v. 34, p. 113-117, 1999.
- FABRICANT, C. G.; FABRICANT, J.; LIBRENTA, M. M.; MINICK, C. R. Virus induced atherosclerosis. **J Exp Med**, n. 148, n. 1, p. 335-340, 1978.
- FALK, E.; SHA, P.; FUSTER, V. Coronary plaque disruption. Circulation, V. 92, p. 657-671, 1995.
- FARB, A.; BURKE, A. P.; TANG, A. L.; LIANG, Y.; MANNAN, P.; SMIALCK, J.; VIRMANI, R. Coronary plaque erosion without rupture into a lipid core. A frequent cause coronary thrombosis in sudden coronary death. **Circulation**, v. 93, n. 7, p. 1354-1363, 1996.
- FONG, I. W.; CHIU, B.; VIIRA, E.; JANG, D.; MAHONY, J. B. De Novo induction of atherosclerosis by *Chlamydia pneumoniae* in rabbit model. **Infect Immun**, v. 67, n. 11, p. 6048-6055, 1999.
- FONSECA, F. A. H.; IZAR, M. C. O. Inter-relação entre aterosclerose e trombose nas síndromes coronárias agudas. In: TIMERMAN, A.; FEITOSA, G. S. (Ed.). **Síndromes coronárias agudas**. São Paulo: Atheneu, 2003. p. 13-20.
- FRYERT, R. H.; SCHWOBE, E. P.; WOODS, M. L.; RODGERS, G. M. Chlamydia species infect human vascular endothelial cells and induce pro-coagulant activity. **J Invest Med**, v. 45, p. 168-174, 1997.
- GAYDOS, C. A.; SUMMERSGILL, J. T.; SAHNEY, N. N.; RAMIREZ, J. A.; QUINN, T. C. Replication of *Chlamydia pneumoniae* in vitro in human macrophages, endothelial cells and aortic artery smooth muscle cells. **Infect Immun**, v. 64, n. 5, p. 1614-1620, 1996.
- GEHARD, M.; GANZ, P. How do we explain the clinical benefits of strogen? From bedside to bench. **Circulation**, v. 92, p. 5-8. 1995.

- GENEST, J.; LIBBY, P.; GOTTO, A. M. Jr. Lipoprotein disorders and Cardiovascular Disease. In: ZIPES, D. P.; LIBBY, P.; BONOW, R. O.; BRAUNWALD, E. (Ed). **Braunwald's heart disease. A textbook of cardiovascular medicine**. USA: Elsevier Saunders, 2005. p. 1013-1034.
- GENG, Y. J.; WU, Q.; MUSZYNSKI, M.; HANSSON, G. K.; LIBBY, P. Apoptosis of vascular smooth muscle cells induced by in vitro stimulation with interferon-gamma, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-1 beta. **Arter Thromb Vasc Biol**, v. 16, n. 1, p. 19-27, 1996.
- GLAGOV, S.; WEISENBERG, E.; ZARIN, C. K.; STAKUNAVICIUS, R.; KOLETTIS, G. J. Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. **N Eng J Med** v.316, p. 1371-1375, 1987.
- GRAYSTON, J. T. Infections Caused by Chlamydia pneumoniae strain TWAR. Clin Infect Dis, v. 15, p. 757-763, 1992
- GRIENDLING, K. K.; ALEXANDER, R. W. Oxidative stress and cardiovascular disease. **Circulation**, v. 96, p. 3264-3265, 1997.
- GRIENDLING, K. K; FITZGERALD, G. A. Oxidative stress and cardiovascular injury. **Circulation**, v. 108, p. 912-916, 2003.
- GUPTA, S.; LEATHAM, E. W. The relation between *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis. **Heart**, v. 77, p. 7-8, 1997.
- HABERLAND, M. E.; FONG, D.; CHENG, L. Malondialdehyde-altered protein occurs in atheroma of Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. **Science**, v. 241, p. 215-218. 1988.
- HACKETT, D.; DAVIES, G.; MASERI, A. Pre-existing coronary stenoses in patients with first myocardial infarction are not necessariy severe. **Eur Heart K**, v. 9, p. 1317-1323, 1988.
- HAMMERSCHLAG, M. R.; CHIRGWIN, K.; ROBLIN, P. M. Persistent infection with *Chlamydia pneumoniae* following acute respiratory illness. **Clin Infect Dis**, v. 14, p. 178-222, 1992.
- HANSON, G. K. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. **N Engl J Med**, v. 352, p. 1685-1695, 2005.
- HARRIS, J. A. S.; KOLOKATHIS, A.; CAMPBELL, M.; CASSEL, G. H.; HAMERSCHLAG, M. R. Safety and efficacy of azithromycin treatment of community acquired pneumonia in children. **Pediatr Infect Dis J**, v. 17, n. 10, p. 865-871, 1998.
- HEALY, A. M.; GELEHRTER, T. D. Induction of plasminogen activator inhibitor-1 in HepG2 human hepatoma cells by mediators of the acute phase response. **J Biol Chem**, v. 269, p. 19.095-19.100, 1994.

- HIGUCHI, M. L.; CASTELLI, J. B.; AIELLO, V. D.; PALOMINO, S.; REIS, M. M.; SAMBIASE, N. V.; FUKASAWA, S.; BEZERRA, H. G.; RAMIRES, J. A. F. Great amount of *Chlamydia pneumoniae* in ruptured plaque vessel segments at autopsy. A comparative study with stable plaques. **Arq Bras Card**, v. 74, n.2, p. 149-151, 2000a.
- HIGUCHI, M. L.; SAMBIASE, N.; PALOMINO, S.; GUTIERREZ, P.; DEMARCHI, L. M.; AIELLO, V. D.; RAMIRES, J. A. F. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* in ruptured atherosclerotic plaques. **Braz J Med Biol Res**, v. 33, p. 1023-1026, 2000b.
- HIGUCHI, M.L.; RAMIRES, J.A.F. Infectious agents in coronary atheromas: a possible role in the pathogenesis of plaque rupture and acute myocardial infarction. **Rev Inst Med Trop SP**, v. 44, n.4, p. 217-224, 2002.
- HIGUCHI, M. L.; GÓIS, J. M.; REIS, M. M.; HIGUCHI-DOS-SANTOS, M. H.; DIAMENT, J.; SOUSA, J. M.; RAMIRES, J. A. F.; OLIVEIRA, S. A. Co-infection ratios versus inflammation, growth factors and progression of early atheromas. **APMIS**, v.114, p. 00-00, 2006.
- HIGUCHI, M. L.; REIS M. M.; SAMBIASE, N. V., PALOMINO, S.; CASTELLI, J. B.; GUTIERREZ, P. S.; RAMIRES, J. A. Co-infection with *M.pneumoniae* and *C.pneumoniae* in ruptured plaques associated with acute myocardial infarction. **Arq Bras Cardiol**, v. 81, p. 12-22, 2003.
- HO, J. E.; PAULTRE, F. P.; MOSCA, L. The gender gap in coronary heart disease mortality: ist there a difference between blacks and whites? **J Women's Health**, v. 14, n. 23, p. 117-127, 2005.
- HU, H.; PIERCE, G. N.; ZHONG, G. The atherogenic effects of chlamydia are dependent on serum cholesterol and specific to *Chlamydia pneumoniae*. **J Clin Invest**, v. 103, p. 747-753, 1999.
- INTO, T.; NODASAKA, Y.; HASEBE, A.; OKUZAWA, T.; NAKAMURA, J.; OHATA, N., SHIBATA, K. Mycoplasmal lipoproteins induce toll-like receptr 2- and caspases-mediated cell death in lymphocytes and monocytes. **Microbiol Immunol**, v. 46, n. 4, p. 265-276, 2002.
- ISNER, J. M.; KEARNEY, M.; BORTMAN, S.; PASSERI, J. Apoptosis in human atherosclerosis and restenosis. **Circulation**, v. 91, n.11, p. 2703-2711, 1995.
- JUDLIN, P. Genital mycoplasmas. Gynecol Obstet Fertil, v. 32, n. 7-8, p. 685-686, 2004.
- KALAYOUGLU, M. V.; MORRISON, R. P.; MORRISON, S. G.; YUAN, Y.; BYRNE, G. I. Chlamydial virulence determinants in atherogenesis: the role of chlamydial lipopolysaccharide and heat shock protein 60 in macrophage lipoprotein interactions. **J Infect Dis**, v. 181, p. S483-9, 2000. Supplementum 3.

- KAUKORANTA-TOLVANEN, S. S.; LAITINEN, K.; SAIKKU, P.; LEINONEN, M. *Chlamydia pneumoniae* multiplies in human endothelial cells in vitro. **Microb Pathog**, v. 16, n. 4, p. 313-319, 1994.
- KAURORANTA-TOLVANEN, S. S.; TEPPO, A. M.; LAITINEN, K.; SAIKKU, P., LINNAVUORI, K.; LEINONEN, M. Growth of *Chlamydia pneumoniae* in cultured human peripheral blood mononuclear cells and induction of cytokine response. **Microb Pathog**, v. 21, n. 3, p. 215-221, 1996.
- KITA, T.; KUME, N.; MINAMI, M.; HAYASHIDA, K.; MURAYAMA, T.; SANO, H. Role of oxidized LDL in atherosclerosis. **Ann N Y Acad Sci**, v. 947, p. 199-205, 2001.
- KOL, A.; LIBBY, P. The mechanisms by which infectious agents may contribute to atherosclerosis and its clinical manifestations. **Trends Cardiov Med**, v. 8, p. 191-199, 1998.
- KONVIDHNUNKIT, W.; KIM, M. S.; MEMON, R.; SHIGENAGA, J.; MOSER, A.; FEINGOLD, K. Effects of infection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism: mechanisms and consequences to the host. **J Lipid Res**, v. 45, p. 1169-96, 2004.
- KRAFT, M.; CASSELL, G. H.; PAK, J. *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* in Asthma. **Chest**, v. 121, p. 1782-1788, 2002.
- KRAUSSE-OPATZ, B.; SCHMIDT, C.; FENDRICH, U.; BIALOWONS, A.; KAEVER, V.; ZEIDLER, H. Production of prostaglandin E2 in monocytes stimulated in vitro by *Chlamydia trachomatis, Chlamydophila pneumoniae,* and *Mycoplasma fermentans.* **Microb Pathog**, v. 37, p. 155-161, 2004.
- KULLER, L. H.; MATTHEWS, K. A.; SUTTON-TYRRELL, K.; EDMUNDOWICZ, D.; BUNKER, C. Coronary and aortic calcification among women 8 years after menopause and their premenopausal risk factors. The healthy women study. **Arter Thromb Vasc Biol**, v. 19, p. 2189-2198, 1999.
- KUO, C. C.; SHOR, A.; CAMPBELL, L. A., FUKISHI, H.; PATTON, D. L.; GRAYSTON, J. T. Demonstration of *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerotic lesions of coronary arteries. **J Infect Dis**, v. 167, n.4, p. 841, 1993.
- LAROSA, J. C.; HUNNINGHAKE, D.; BUSH, D.; CRIQUI, M. H.; GETZ, G. S.; GOTTO JR., A. M.; GRUNDY, S. M.; RAKITA, L.; ROBERTSON, R. M.; WEISFELDT, M. L. The cholesterol facts. **Circulation**, v. 81, v. 5, p. 1721-1733, 1990.
- LEHTINIEMI, J.; KARHUNEN, P. J.; BOEBELER, S.; NIKKARI, S. T. Identification of different bacterial DNAs in human coronary arteries. **J Clin Invest**, v. 35, p. 13-16, 2005.
- LENDON, C. L.; DAVIES, M. J.; BORN, G. V.; RICHARDSON, P. D. Atherosclerotic plaque caps are locally weakened when macrophages density is increased. **Atherosclerosis**, v. 87, n. 1, p. 87-90, 1991.

- LI, H. J.; CYBULSKY, M. I.; GIMBRONE, M. A. Jr; LIBBY, P. An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit endothelium. **Arterioscler Thromb**, v. 13, n. 2, p. 197-204, 1993.
- LI, X.; KOLLTWEIT, K. M.; TRONSTAD, L.; OLSEN, I. Systemic diseases caused by oral infection. Clin Microbiol Rev, v. 13, p. 547-558, 2000.
- LIAO, W. Endotoxin: possible roles in initiaion and development of atherosclerosis. **J Lab Clin Med**, v. 128, p. 452-60, 1996.
- LIBBY, P. The molecular bases of the acute coronary syndromes. **Circulation**, v. 91, p. 2844-2850, 1995.
- LIBBY, P. The vascular biology of atherosclerosis. In: BRAUNWALD, E.; ZIPES, D. D.; LIBBY, P. (Ed). **Heart disease. A textbook of cardiovascular medicine**. Philadelphia: WB Saunders, 2005, p. 995-1009.
- LIBBY, P.; MASERI, A.; RIDKER, P. Inflammation and atherosclerosis. **Circulation**, v. 105, p. 1135-1143, 2002.
- LINNANMAKI, E.; LEINONEN, M.; MATTILA, K.; NIEMINEN, M. S.; VALTONEN, V.; SAIKKU, P. *Chlamydia pneumoniae* specific circulating immune-complexes in chronic coronary artery disease. **Circulation**, v. 87, v. 4, p. 1130-1134, 1993.
- LIU, C.; WATERS, D. D. *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis: from Koch's postulates to clinical trials. **Prog Cardiov Dis**, v. 47, n. 4, p.230-239, 2005.
- LIU, L.; HU, H.; JI, H.; MURDIN, A. D.; PIERCE, G. N.; ZHONG, G. *Chlamydia pneumoniae* infection significantly exacerbates aortic atherosclerosis in na LDLR mouse model within six months. **Mol Cell Bioch**, v. 215, n. 1-2, p. 123-128, 2000.
- LIUBA, P.; KARNANI, P.; PESONEN, E.; PAAKKARI, I.; FORSLID, A.; JOHANSSON, L.; PERSSON, K.; WADSTROM, T.; LAURINI, R. Endothelial dysfunction after repeated *Chlamydia pneumoniae* infection in apolipoiprotein E-knockout mice. **Circulation**, v. 102, p. 1039-1044, 2000.
- LIUBA, P.; PESONEN, E. Infection and early atherosclerosis: Does the evidence support causation? **Acta Pediatrica**, v. 94, p. 643-651, 2005.
- LIUBA, P.; PESONEN, E.; PAAKKARI, I.; BATRA, S.; ANDERSEN, L.; FORSLID, A.; YLA-HERTTUALA, S.; PERSSON, K.; WADSTROM, T.; WANG, X.; LAURINI, R. Coinfection with *Chlamydia pneumoniae* and *Helicobacter pylori* results in vascular endothelial dysfunction and enhanced VCAM-1 expression in apoE-konckout mice. **J Vasc Res**, v. 40, p. 115-122, 2003.

- LOREE, H. M.; KAMM, R. D.; STRINGFELOW, R. G.; LEE, R. T. Effects of fibrous cap thickness on peak circumferential stress in model atherosclerotic vessels. **Circ Res**, v. 71, n.4, p. 850-858, 1992.
- MANILOFF, J. The minimal cell genome: "on being the right size". **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 93, p. 19, p. 10004-10006, 1996.
- MANN, C. J.; TROUSSARD, A. A.; YEAN, F. T.; HANNOUCHE, N.; NAJIB, J.; FRUCHART, J. C.; LOTTEAU, V.; ANDRE, P.; BIHAIN, B. E. Inhibitory effects of specific apolipoprotein C-III isoforms on the binding of triglyceride-rich lipoproteins to the lipolysis-stimulated receptor. **J Biol Chem**, n. 272, n. 50, p. 313-348, 1997.
- MELNICK, J. L.; ADAM, E.; DEBAKEY, M. E. Cytomegalovirus and atherosclerosis. **Eur Heart J**, v. 14, p. 30-38, 1993.
- MOAZED, T. C.; CAMPBELL, L. A.; ROSENFELD, M. E.; GRAYSTON, J. T.; KUO, C. C. *Chlamydia pneumoniae* infection accelerates the progression of atherosclerosis in apolipoprotrein E-deficient mice. **J Infect Dis**, v. 180, p. 238-241, 1999.
- MOAZED, T. C.; KUO, C. C.; GRAYSTON, J. T.; CAMPBELL, L. A. Evidence of systemic dissemination of *Chlamydia pneumoniae* via machrophages in the mouse. **J Infect Dis**, v. 177, p. 1322-1325, 1998.
- MOAZED, T.C.; KUO, C.C.; GRAYSTON, J.T.; CAMPBELL, L.A. Murine models of *Chlamydia pneumoniae* infection and atherosclerosis. **J Infect Dis**, v. 175, p. 883-890, 1997.
- 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, v. 176, p. 139-144, 2004.
- MORENO, P. R.; FALK, E.; PALACIOS, I. F.. Macrophage infiltration in acute coronary syndromes. Implications for plaque rupture. **Circulation**, v. 90, p. 775-8, 1994.
- MOULDER, J. W. Chlamydiales. In: **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984, p. 729-729.
- MS/FUNASA/Cenepi-Sistema de informações sobre Mortalidade (SIM): http://tabmet.dadtasus.gov.br . Acesso em 05/02/2006.
- MYERBURG, R. J.; INTERIAN JR., A.; MILTRANI, R. M.; KESSLER, K. M.; CASTELLANOS, A. Frequency of sudden cardiac death and profiles of risk. **Am J Cardiol**, v. 80, n. 5B, p. 10F-19F, 1997.
- NAGHAVI, M. et al. From vulnerable plaque to vulnerable patient. A call for new definitions and risk assessment strategies: Part 1. **Circulation**, v. 108, p. 1772-1778, 2003a.

NAGHAVI, M. et al. From vulnerable plaque to vulnerable patient. A call for new definitions and risk assessment strategies: Part II. **Circulation**, v. 108, p. 1664-1672, 2003b.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Guide for the care and use of laboratory animals. Washington: National Academic Press, Washington, 1996. 83 p.

NELSON, J. G. Infectious catarrh of the albino rat. I.Experimental transmission in relation to the role of *Actinobacillus muris*. II. The causal relation of coco-bacilliform bodies. **J Exp Med**, v. 72, p. 645-654, 1940.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Lehninger: Princípios de bioquímica. São Paulo: Sarvier, 2004. p.179-199.

NICHOLSON, G. L.; GAN, R.; HAIER, J. Multiple co-infections (Mycoplasma, Chlamydia, human herpes virus-6) in blood of chronic fatigue syndrome patients: association with signs and symptoms. **APMIS**, v. 111, p. 557-566, 2003.

NYKANEN, A. I.; KREBS, R.; TIKKANEN, J. M.; RAISKY, O.; SIHVOLA, R.; WOOD, J. Combined vascular endothelial growth factor and platelet derived growth factor inhibition in rat cardiac allografts: beneficial effects on inflammation and smooth muscle cell proliferation. **Transplatation**, v. 79, p. 182-189, 2005.

O'BRIEN, K.; ALLEN, M.; MCDONALD, T.; CHAIT, A.; HARLAN, J.M., FISHBEIN, D.; MCCARTY, J.; FERGUSON, M.; HUDKINS, K.; BENJAMIN, C.D. 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**, v. 92, n. 2, p. 945-951, 1993

O'CONNOR, S.; TAYLOR, T.; CAMPBELL, L. A.; EPSTEIN, S.; LIBBY, P. Potential infectious etiologies of atherosclerosis: a multifactorial perspective. **Emerg Infect Dis**, v. 15, p.780-789, 2001.

OTT, S. J.; MOKHTARI, N. E. E.; MUSFELDT, M.; HELLMIG, S.; FREITAG, S.; REHAMAN, A.; KÚHBACHER, T.; NIKOLAUS, S.; NAMSOLLECK, P.; BLASUT, M.; HAMPE, J.; SAHLY, H.; REINECKE, A.; HAAKE, N.; GUNTHER, R.; DRUGER, D.; LINS, M.; HERRMANN, G.; FOLSCH, U. R.; SIMON, R.; SCHREIBER, S. Detection of diverse bacterial signatures in atherosclerotic lesions of patients with coronary heart disease. **Circulation**, v. 113, p. 929-937, 2006.

PADDENBERG, R.; WULF, S.; WEBER, A.; HEIMANN, P.; BECK, L. A.; MANNHERZ, H. G. Internucleosomal DNA fragmentation in cultured cells under conditions reported to induce apoptosis may be caused by mycoplasma endonucleases. **Eur J Cell Biol**, v. 71, n. 1, p. 105-119, 1996.

PAIGEN, B.; KOVATS, S. E.; CHAPMAN, M. H.; LIN, C. Y. Characterization of a genetic difference in the platelet aggregation response of two inbred mouse strains, C57BL/6 and C3H/He. **Atherosclerosis**, v. 64, p. 181-190, 1987.

- PAIGEN, B.; MORROW, A.; BRANDON, C.; MITCHELL, D.; HOMES, P. Variation in suscetibility to atherosclerosis among inbred strains of mice. **Atherosclerosis**, v. 57, n. 1, p. 65-73, 1985.
- PATEL, P.; MENDALL, M. A.; CARRINGTON, D.; STRACHAN, D. P.; LEATHAM, E.; MOLINEAUX, N.; LEVY, J.; BLAKESTON, C.; SEYMORUR, C. A.; CAMM, A. J. Association of *Helicobacter pylori* and *Chlamydia pneumoniae* infections with coronary heart disease and cardiovascular risk factors. **BMJ**, v. 311, p. 711-714, 1995.
- PISLARU, S. V.; VAN DER WERF, F. Antibiotic therapy for coronary artery disease: can a WIZARD change it all? **JAMA**, v. 290, p.1515-6, 2003.
- PITCHER, D. G.; NICHOLAS, R. A. J. Mycoplasma host specificity: fact or fiction? **Vet J**, v. 170, p. 300-306, 2005.
- PLUMP, A. S.; SMITH, J. D.; HAYEK, T.; AALTO-SETALA, K.; WALSH, A.; VERSTUVFT, J. G.; RUBIN, E. M.; BREWLOW, J. L. Severe hypercholestrolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. **Cell**, v. 71, n.2, p. 343-353, 1992.
- PRASAD, A.; ZHU, J.; HALCOX, J.; WACLAWIW, M.; WPSTEIN, S.; QUYYUMI, A. Predisposition to atherosclerosis by infections: role of endothelial dysfunction. **Circulation**, v. 106, p. 184-190, 2002.
- PROCHNAU, D.; RODEL, J.; HARTMANN, M.; STRAUBE, E.; FIGULLA, H. R. Growth factor production in human endothelial cells after *Chlamydophila pneumoniae* infection. **Int J Med Microbiol**, v. 294, p. 53-57, 2004.
- RAFFAI, R.; MAURICE, R.; WEISGRABER, K.; INNERARITY, T.; WANG, X.; MACKENZIE, R.; HIRAMA, T.; WATSON, D.; RASSART, E.; MILNE, R. Molecular characterization of two monoclonal antibodies specific for the LDL receptor-binding site of human apolipoprotein E. **J Lipid Res**, v. 36, n. 9, p. 1905-1918, 1995.
- RAINES, E. W. PDGF and cardiovascular disease. Cytok Growth Fact Rev, v. 15, p. 237-254, 2004.
- RAZIN, S. Peculiar properties of mycoplasmas: the smallest self-replicatin prokaryotes. **FEMS. Microbiol Let,** v. 100, p. 423-432, 1992.
- RAZIN, S.; YOGEV, D.; NAOT, Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. **Microbiol Molec Biol Rev**, v. 62, p. 1094-1156, 1998.
- REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscope. **J Cell Biol**, v. 17, p.208-212, 1963.

ROCKEY, D. D.; FISCHER, E. R.; HACKSTADT, T. Temporal analysis of the developing *Chlamydia psittacci* inclusion by use of fluorescence on electron microscopy. **Infect Immun**, v. 64, p. 4629-4678, 1996.

RODWELL, A. W.; WHITCOMB, R. F. Methods for direct and indirect measurement In: RAZIN, S.; TULLY, J.G. (ED). **Methods in mycoplasmology. Mycoplasma characterization**. New York: Academic Press, 1985. p.185-185.

ROSENFELD, M. E.; ROSS, R. Macrophage and smooth muscle cell proliferation in atherosclerotic lesions of WHHL and comparably hipercholesterolemic fat-fet rabbits. **Arteriosclerosis**, v. 10, p. 680-687, 1990.

ROSS, R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. N Engl J Med, v. 340, p.115-126, 1999.

ROTHSTEIN, N. M.; QUINN, T. C.; MADICO, G.; GAYDOS, C. A.; LOWENSTEIN, C. J. Effect of azithromycin on murine atherosclerosis exacerbated by Chlamydia pneumoniae. **J Infect Dis**, v. 183, p. 232-238, 2001.

ROTTEM, S. Interaction of mycoplasmas with host cells. **Physiol Rev**, v. 83, p. 417-432, 2003.

RUUTH, E.; PRAZ, F. Interactions between mycoplasmas and the immune system. **Immunol Rev**, v. 112, p. 133-160, 1989.

SAKAI, M.; KOBORI, S.; MIYAZAKI, A.; HORIUCHI, S. Macrophage proliferation in atherosclerosis. **Curr Opin Lipidol**, v. 11, p. 503-509, 2000.

SAIKKU, P. Chlamydia pneumoniae infection as a risk factor in acute myocardial infarction. **Eur Heart J**, v. 14, p. 62-65, 1993. Supplementum K.

SAIKKU, P.; LEINONEN, M.; MATTILA, K.; EKMAN, M. R.; NIEMINEN, M. S.; MAKELA, P. H.; HUTTUNEN, J. K.; VALTONEN, V. Serologic evidence of an association of a novel Chlamydia, TWAR, with coronary artery disease and acute myocardial infarction. **Lancet**, v. 2, p. 983-986, 1988.

SAWAMURA, T.; KURNE, A.; AOYAMA, T.; MORIWAKI, H.; HOSHIKAWA, H.; AIBA, Y.; TANAKA, T.; MIWA, S.; KATSURA, Y.; KITA, T.; MASAKI, T. An endotelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. **Nature**, v. 386, p. 73-77, 1997.

SHIOMI, M.; YAMADA, S.; ITO, T. Atheroma stabilizing effects of simvastatin due to depression of macrophages or lipid accumulation in the atheromatous plaques of coronary plaque-prone WHHL rabbits. **Atherosclerosis**, v. 178, p. 287-294, 2005.

SHOR, A.; PHILLIPS, J. I. *Chlamydophila pneumoniae* and atherosclerosis. **JAMA**, v. 282, p. 2071-2073, 1999.

- SMITH, J.D. Mouse Models of atherosclerosis. Lab An Sci, v. 48, n. 6, p. 573-579, 1998.
- STENVINKEL, P.; HEIMBURGER, O.; JOGESTRAND, T. Elevated interleukin-6 predicts progressive carotid artery atherosclerosis in dialysis patients: association with *Chlamydia pneumoniae* seropositivity. **Am J Kidney Dis**, v. 39, p. 274-282, 2002.
- TAYLOR-ROBINSON, D.; THOMAS, B. J. *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerotic tissue. **J Infect Dis**, v. 18, p. S347-340, 2000. Supplementum 3.
- THOM, D. H.; WANG, S. P.; GRAYSTON, J. T.; SISCOVICK, D. S.; STEWART, D. K.; KRONMAL, R. A.; WESS, N. S. *Chlamydia pneumoniae* strain TWAR antibody and angiographycally demonstrated coronary artery disease. **Arterioscl Thromb**, v. 11, n. 3, p. 547-551, 1991.
- TONG, C. Y. W.; DONNELLY, C.; HARVEY, G. Multiplex polymerase chain reaction for the simultaneous dectetion of *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae* and *Chlamydia psittaci* in respiratory samples. **J Clin Patol**, v. 52, p. 257-263, 1999.
- TORMAKANGAS, L.; ERKKILA, L.; KORHONEN, T.; TIIROLA, T.; BLOIGU, A.; SAIKKU, P.; LEINONEN, M. Effects of repeated *Chlamydia pneumoniae* on aortic lipid accumulation and inflammatory response in C57BL/6J mice. **Infect Immun**, v.73, n.10, 6458-6466, 2004.
- TULLY, J. G. Culture medium formulation for primary isolation and maintenance of Mollicutes. In: RAZIN, S.; TULLY, J. G. (Ed.). **Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmology**. New York: Academic Press, 1995. p.33-40.
- van der WAL, A. C.; BECKER, A. E.; van der LOOS, C. M.; DAS, P. K. Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaque sis characterized by an inflammatory process irrespective of the dominante plaque morphology. **Circulation**, v. 89, n. 1, p. 36-44, 1994.
- van NEROM, A.; DUCATELLE, R.; CHARLIER, G.; HASESEEBROUCK, F. Interaction between turkey monocytes and avian *Chlamydia psittaci* in the presence of *Mycoplasma sp*: the importance of nitric oxide. **Dev Comp Immunol**, v. 24, p. 417-432, 2000.
- van REE, J. H.; van den BROEK, W. J. A. A.; DAHLMANS, V. E. H.; GROOT, P. H. E.; VIDGEON-HART, M.; FRANTS, R. R.; WIERINGA, B.; HAVEKES, L. M.; HOFKER, M. H. Diet-induced hypercholesterolemia and atherosclerosis in heterozygous apolipopreotein Edeficient mice. **Atherosclerosis**, v. 111, p. 25-37, 1994.
- Van TOL, A. Phospholipid transfer protein. Curr Opin Lipidol, v. 13, p.135, 2002.
- VESSELINOVITCH, D. Animal models and the study of atherosclerosis. **Arch Pathol Lab Med,** v. 112, p. 1011-1017, 1988.

VIEIRA, N. W.; RAMIRES, J. A. F. Inflamação nas síndromes coronárias agudas. In: TIMERMAN, A.; FEITOSA, G. S. (Ed.). **Síndromes coronárias agudas**. São Paulo: Atheneu, 2003, p.3-12.

VINK, A.; POPPEN, M.; SCHONEVELD, A. H.; ROHOLL, P. H.; de KELIJN, D. P.; BORST, C.; PASTERKAMP, G. Distribution of *Chlamydophila pneumoniae* in the human arterial system and its relation to the local amount of atherosclerosis within the individual. **Circulation**, v. 103, p. 1613-1617, 2001.

VIRMANI, R.; BURKE, A.P.; FARB, A. Plaque rupture and plaque erosion. **Thromb Haemost**, v. 82, p. 1-3, 1999. Supplementum 1.

VITA, J. A.; LOSCALZO, J. Shouldering the risk factor burden: infection, atherosclerosis, and the vascular endothelium. **Circulation**, v. 106, p. 164-166, 2002.

WARDEN, C. H.; HEDRICK, C. C.; QIAO, J. H.; CASTELLANI, L. W.; LUSIS, A. J. Atherosclerosis in transgenic mice overxpressing apolipoprotein A-II. **Science**, v. 261, p. 469, 1993.

WEISGRABER, K. H. Apoliporotein E: structure-function relationships. **Adv Prot Chem**, v. 45, p. 249-302, 1994.

WITTERMANN, J. C. M.; KOK, F. J.; van SAASE, J. L. C. M. Aortic calcification as a predictor of cardiovascular mortality. **Lancet**, v. 2, p. 1120-1122, 1986.

WIGHT, T. N. The extracellular matrix and atherosclerosis. **Curr Opin Lipidol**, v. 6, n. 5, p. 326-334, 1995.

YANG, Z. P.; KUO, C. C.; GRAYSTON, J. T. Systemic dissemination of *Chlamydia pneumoniae* following intranasal inoculation in mice. **J Infect Dis**, v. 171, p.736-738, 1995.

YLA-HERTTUALA, S.; PALINSKI, W.; ROSENFELD, M. E.. Evidence for the presence of oxidatively modified low densityh lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. **J Clin Invest**, v. 84, p. 1086-95, 1989.

ZHANG, S. H.; REDDICK, R. L.; PIEDRAHITA, J. A.. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lackin apolipoprotein E. **Science**, v. 258, p. 468-471, 1992.

ZHANG, S. H.; REDDICK, R. L.; AVDIEVICH, E.; SURLES, L. K.; JONES, R. G.; REYNOLDS, J. B.; QUARFORDT, S. H.; MAEDA, N. Paradoxical enhancement of atherosclerosis by probucol treatment in apoliporpotein E-deficient mice. **J Clin Invest**, v. 99, n.12, 1858-2866, 1997.

APÊNDICE A

Grupo	Protocolo	Protocolo Perímetro externo µm	Perímetro interno µm	Perímetro Diâmetro da interno artéria µm µm	Diâmetro da luz μm	Altura da placa µm	Área da placa mm²	Área de gordura mm²	Área da luz mm²	Área da artéria mm²	Porcentagem de obstrução %
SEM COLESTEROL SEM INFECÇÃO FÊMEA	88 80 80 80 80 80 80 80 80 80 80 80 80 8	2449 2563 3604 2411 3297 3286 2138 2267	2142 2250 3324 2162 2824 2996 1872 2031	265 456 383 463 651 623 536 352	186 386 238 405 475 470 470 288 309	0 0 93 0 110 86 0 0 0	0,00 0,00 0,03 0,00 0,02 0,02 0,00 0,00	0,00 0,00 0,00 0,00 0,00 0,00 0,00 0,0	0,36 0,40 0,87 0,37 0,63 0,71 0,27 0,32 1,03	0,47 0,52 1,03 0,46 0,86 0,85 0,36 0,40 1,41	0 0 4 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
SEM COLESTEROL COM INFECÇÃO C.pneumoniae FÊMEA	80 82 83 83 84 84 86 87 87	3101 3854 2883 3332 3612 3734 2879 5189	2789 3413 2660 3166 3411 3555 2604 4921	479 608 215 421 447 465 210 379	376 507 159 375 378 416 142 283	305 163 139 327 177 265 75	0,28 0,24 0,12 0,30 0,05 0,05	0,04 0,02 0,01 0,01 0,01 0,00 0,00	0,61 0,92 0,56 0,79 0,92 1,00 0,53 1,92	0,76 1,18 0,66 0,88 1,03 1,11 0,65 2,14	26 23 23 38 36 10 17

APÊNDICE A

Porcentagem de obstrução %	27 35 16 9	25 21 22 33 33 0 0 0 15
Área da artéria mm²	2,93 0,89 1,43 1,84 0,63	0,51 0,47 1,19 0,76 0,28 0,17 0,85
Área da luz mm²	2,64 0,74 1,33 1,48 0,53	0,34 0,55 0,58 0,19 0,12 0,65
Área de gordura mm²	0,15 0,07 0,05 0,01 0,01	0,00 0,00 0,00 0,00 0,00 0,00 0,00
Área da placa mm²	0,72 0,25 0,22 0,22 0,14 0,03	0,08 0,07 0,26 0,04 0,00 0,00 0,00
Altura da placa µm	413 257 98 80 65	112 127 263 185 96 95 0 329 78
Diâmetro da luz µm	413 296 527 209 214	172 158 330 367 369 280 339 339
Diâmetro da artéria µm	606 367 626 326 363	272 254 425 505 509 373 421 1239 208
Perímetro interno µm	5768 3053 4102 4323 2587	2086 2093 3706 2642 2209 2719 1574 1239
Perímetro externo µm	6072 3345 4239 4815 2831	2541 2448 3873 3106 2678 3103 1897 1495 3272
Protocolo	15(1) 15(2) 15(3) 16(1) 16(2)	22(1) 23(2) 23(1) 23(1) 24(1) 24(1) 25(1) 25(1) 26
Grupo	SEM COLESTEROL COM INFECÇÃO M.pneumoniae FÊMEA	SEM COLESTEROL COM INFECÇÃO C.pneumoniae e M.pneumoniae FÊMEA

APÊNDICE B

				Diâmetro	Diâmetro						
Grupo	Protocolo P	Perímetro	Perímetro	da	da	Altura da	Área da	Área de	Área da	Área da	Porcentagem
		externo	interno	artéria	Inz	placa	placa	gordura	Înz	artéria	de obstrução
		шm	шп	шm	шm	шп	mm^2	mm^2	mm^2	mm^2	%
COM COLESTEROL	12(1)	2673	2260	258	144	112	0,04	00,00	0,40	0,56	10
SEM INFECÇÃO	12(2)	2312	2168	445	292	181	0,17	0,02	0,37	0,42	47
FÊMEA	12(3)	1644	1341	200	105	0,00	0,00	0,00	0,14	0,21	0
	13(1)	2465	2039	515	369	146	0,04	0,01	0,33	0,48	15
	13(2)	2616	2356	473	436	340	0,21	0,05	0,44	0,54	50
	13(3)	3574	3039	504	401	209	0,27	0,05	0,73	1,01	38
	49(1)	3731	3188	401	262	173	0,24	0,02	0,80	1,10	30
	49(2)	1751	1605	254	154	0,00	0,00	0,00	0,20	0,24	0
	50(1)	3558	3071	403	262	232	0,25	0,02	0,75	1,00	34
	50(2)	2583	2219	359	268	255	0,14	0,05	0,39	0,53	36
	51(1)	2274	2381	207	130	105	0,02	0,01	0,41	0,45	14
COM COLESTEROL	44(1)	3049	2692	362	327	322	0,20	0,01	0,57	0,74	35
COM INFECÇÃO	44(2)	3209	2904	337	257	257	0,27	0,05	0,67	0,81	41
C.pneumoniae	45	4994	4707	213	120	80	0,36	0,01	1,76	1,98	21
FÊMEA	46(1)	3043	2614	299	198	167	0,16	0,01	0,54	0,73	30
	46(2)	2605	2207	386	276	276	0,21	0,01	0,38	0,54	57
	47(1)	4576	4131	307	193	143	0,64	0,02	1,35	1,66	47
	47(2)	2963	2696	437	348	317	0,27	0,02	0,57	69,0	48
	48	3091	2543	328	235	208	0,25	0,02	0,51	0,76	49

APÊNDICE B

Grupo	Protocolo	Perímetro externo µm	Perímetro interno µm	Diâmetro da artéria µm	Diâmetro da luz µm	Altura da placa µm	Área da placa mm²	Área de gordura mm²	Área da luz mm²	Área da artéria mm²	Porcentagem de obstrução %
COM COLESTEROL COM INFECÇÃO M.pneumoniae FÊMEA	3(1) 3(2) 3(2) 3(3) 3(4) 4(1) 4(2) 100 100 101	4365 4122 2377 2817 2436 2155 1952 1952 2138 3393 3393 2824 3314	3992 3771 2076 2418 2009 1793 1628 2021 3156 2600 3049	342 419 445 254 175 387 284 294 653 653 318	199 292 330 173 113 303 174 183 561 474 261	118 286 321 159 0 0 0 133 154 461 265 242 238	0,43 0,29 0,23 0,17 0,00 0,00 0,05 0,24 0,24 0,30 0,30 0,15	0,05 0,03 0,00 0,00 0,00 0,00 0,09 0,09	1,26 1,13 0,34 0,46 0,47 0,25 0,21 0,79 0,79 0,79	1,51 1,35 0,44 0,63 0,36 0,36 0,36 0,91 0,63 0,87	35 26 67 38 0 0 0 28 76 57 41 21
COM COLESTEROL COM INFECÇÃO C.pneumoniae e M.pneumoniae FÊMEA	27(1) 27(2) 28(1) 28(2) 29(1) 29(2) 30(1) 30(2)	3562 3474 2807 3328 2810 3312 3251 5166	3177 3054 2515 2887 2526 3182 2883 4662	303 407 736 537 262 813 498 420	204 354 620 440 164 695 306	199 354 214 290 135 675 420 184	0,20 0,23 0,18 0,38 0,14 0,75 0,35	0,01 0,02 0,04 0,06 0,02 0,12 0,11	0,80 0,74 0,50 0,66 0,50 0,80 0,80 1,73	1,01 0,96 0,62 0,88 0,62 0,87 0,84 2,12	26 31 36 58 58 29 93 16

APÊNDICE C

Grupo	Protocolo P	Perímetro externo µm	Perímetro interno µm	Diâmetro da Diâmetro da artéria luz µm µm	Diâmetro da luz µm	Altura da placa µm	Área da placa mm²	Área de gordura mm²	Área da luz mm²	Área da artéria mm²	Porcentagem de obstrução %
SEM COLESTEROL SEM INFECÇÃO MACHOS	18(1) 18(2) 19 20(1) 20(2) 21	3950 2933 2688 2171 1997 3252	3583 2473 2301 1758 1721 3088	521 292 240 321 423 367	370 147 124 238 354 207	88 32 25 0 0 24	0,05 0,02 0,01 0,00 0,00 0,00	0,03 0,02 0,00 0,00 0,00 0,00	1,02 0,48 0,42 0,24 0,23 0,75	1,24 0,68 0,57 0,37 0,31 0,84	998004
SEM COLESTEROL COM INFECÇÃO C.pneumoniae MACHOS	35(1) 35(2) 36(1) 36(2) 37(1) 37(2) 38(1) 38(2)	2529 2218 1726 2953 4222 5038 2726	2228 1918 1414 2636 3945 4672 2277	318 277 100 286 189 574 266 443	238 205 15 202 146 368 168 307	178 201 0 176 127 262 168 307	0,14 0,15 0,00 0,20 0,26 0,24 0,15 0,16	0,03 0,05 0,00 0,01 0,01 0,04 0,08	0,39 0,29 0,15 0,55 1,23 1,73 0,41	0,50 0,39 0,23 0,69 1,41 2,02 0,59 0,59	35 53 0 0 21 14 40

APÊNDICE C

Grupo	Protocolo	Perímetro externo µm	Perímetro interno µm	Diâmetro da artéria µm	Diâmetro da luz μm	Altura da placa µm	Área da placa mm²	Área de gordura mm²	Área da luz mm²	Área da Artéria mm²	Porcentagen de obstrução %
SEM COLESTEROL COM INFECÇÃO M.pneumoniae MACHOS	16(1) 16(2) 16(3) 16(4) 17(1) 17(2) 17(3) 17(4)	4815 2831 2837 2931 3774 2089 2938 3192	4323 2587 2356 3405 3234 1825 2565	326 363 738 709 661 383 441	209 214 640 589 589 278 233 207	173 65 60 160 147 0 216 180	0,14 0,03 0,01 0,15 0,05 0,00 0,11	0,01 0,01 0,00 0,00 0,02 0,00 0,09	1,48 0,53 0,44 0,58 0,83 0,26 0,52 0,60	1,84 0,63 0,64 0,68 1,13 0,34 0,68	22 30 30
SEM COLESTEROL COM INFECÇÃO C.pneumoniae e M.pneumoniae MACHOS	8(1) 8(2) 8(3) 10(1) 10(2) 10(3) 11(1) 11(1)	2687 4423 4600 2405 2380 3647 5038 2675 2404	2376 3983 4309 2058 1983 3194 4358 4456 1961	413 471 550 220 223 571 553 356 276	297 353 366 123 118 320 443 200 138	229 103 81 0 65 244 396 117 103	0,16 0,03 0,02 0,02 0,02 0,16 0,14 0,04 0,04	0,05 0,00 0,00 0,00 0,00 0,01 0,01	0,44 1,26 1,47 0,33 0,31 0,81 1,51 1,58 0,30	0,57 1,55 1,68 0,46 0,45 1,05 2,02 0,56 1,81 0,04	36 0 0 3 3 3 3 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0

APÊNDICE D

Porcentagem de obstrução %	6 17 30 48 36 30	15 44 19 29 41 33 33 54
Área da artéria mm²	0,44 1,10 0,61 0,43 0,72 0,82 0,81	0,96 0,58 0,55 0,60 0,51 1,28 1,96 0,57
Área da luz mm²	0,33 0,85 0,39 0,60 0,60 0,62	0,82 0,42 0,43 0,46 0,36 1,12 1,53 0,46
Área de gordura mm²	0,00 0,01 0,02 0,04 0,05 0,02	0,03 0,08 0,01 0,02 0,05 0,14 0,13 0,09
Área da placa mm²	0,01 0,14 0,11 0,17 0,21 0,18	0,12 0,18 0,06 0,13 0,14 0,37 0,32
Altura da placa µm	47 153 150 150 208 212 236	286 298 92 160 49 317 387 250 199
Diâmetro da luz μm	93 228 165 189 208 212 266	308 298 157 180 333 317 387 270
Diâmetro da artéria µm	184 370 293 286 340 328 418	408 341 279 288 459 406 493 350 301
Perímetro interno µm	2038 3274 2214 2147 2747 2802	3222 2298 2348 2422 2130 3760 4394 2427 2750
Perímetro externo µm	2370 3728 2784 2343 3027 3200	3485 2707 2632 2751 2532 4022 4967 2699 3188
Protocol 0	52(1) 52(2) 53(1) 53(1) 54(1) 54(2) 55	39(1) 39(2) 40(1) 40(2) 41(1) 42(1) 42(2)
Grupo	COM COLESTEROL SEM INFECÇÃO MACHOS	COM COLESTEROL COM INFECÇÃO C.pneumoniae MACHOS

APÊNDICE D

Porcentagem de obstrução %	16 20 25 27 36 8 8 23	28 18 28 42 42 48
Área da artéria mm²	0,60 1,58 1,49 0,72 0,83 0,66 0,64 0,90	0,52 0,61 0,47 0,29 0,65 1,00
Área da luz mm²	0,49 1,34 1,43 0,53 0,63 0,53 0,77 0,77	0,41 0,45 0,36 0,21 0,49 0,86
Área de gordura mm²	0,02 0,12 0,15 0,06 0,01 0,01 0,04	0,01 0,00 0,08 0,01 0,01 0,10
Área da placa mm²	0,07 0,27 0,36 0,14 0,22 0,04 0,15 0,30	0,11 0,08 0,20 0,05 0,20 0,21
Altura da placa µm	191 300 350 193 241 66 150 230	149 112 252 106 206 613
Diâmetro da luz µm	270 380 470 208 269 104 190 432	149 130 262 125 206 703
Diâmetro da artéria µm	473 480 579 319 347 210 283 492	205 209 320 189 312 846
Perímetro interno µm	2484 4106 4245 2599 2914 2583 2585 3115	2276 2387 2134 1638 2486 3301
Perímetro externo µm	2762 4455 4328 3015 3232 2884 2838 3363	2580 2784 2439 1919 2867 3546
Protocol o	5(1) 5(2) 5(3) 5(3) 5(4) 106 107 110	31(1) 31(2) 32(1) 32(2) 33 34
Grupo	COM COLESTEROL COM INFECÇÃO M.pneumoniae MACHOS	COM COLESTEROL COM INFECÇÃO C,pneumoniae e M.pneumoniae MACHOS