IRINEU LUIZ MAIA

**Análise da prevalência de *Chlamydia Pneumoniae* e
Mycoplasma Pneumoniae em diferentes formas de
apresentação da doença coronária obstrutiva**

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

**Área de concentração: Cardiologia
Orientador: Prof. Dr. José Carlos Nicolau**

São Paulo

2006

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Maia, Irineu Luiz

Análise da prevalência de *Chlamydia pneumoniae* e *Mycoplasma pneumoniae*
em diferentes formas de apresentação da doença coronária obstrutiva / Irineu Luiz
Maia. -- São Paulo, 2006.

Tese (doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Cardio-Pneumologia.

Área de concentração: Cardiologia.

Orientador: José Carlos Nicolau.

Descritores: 1.Chlamydia pneumoniae 2.Mycoplasma pneumoniae 3.Isquemia
miocárdica 4.Arteriosclerose coronária 5.Testes sorológicos

USP/FM/SBD-142/06

EPÍGRAFE

“Três paixões simples, mas irresistivelmente fortes governam minha vida: o desejo imenso de amar, a procura do conhecimento e a insuportável compaixão pelo sofrimento da humanidade”.

BERTRAND RUSSEL

DEDICATÓRIA

- ✓ Aos meus pais, Mário e Adelaide pelo exemplo do que é ser verdadeiro e justo.
- ✓ Aos meus filhos Melissa, Aline, Thiago e Beatriz, verdadeira razão da minha vida.
- ✓ À minha esposa Lília, amada e companheira, ponto de união entre o amor e a felicidade.

DEDICATÓRIA

- ✓ Ao Prof. Dr. José Carlos Nicolau, meu amigo e mestre, pelo incentivo constante na minha formação acadêmica, idealizador e orientador deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

- ✓ Ao Prof. Dr. José Carlos Nicolau, responsável principal por este trabalho.
- ✓ Aos Doutores Paulo Ricardo de Fernando Rocha e Isabela Thomaz Takakura, pela ajuda na seleção dos pacientes.
- ✓ Ao Doutor Maurício de Nassau Machado, colaborador importante na realização deste trabalho.
- ✓ À enfermeira Reneé Costa Amorim e auxiliar de enfermagem Natalina Aparecida Sanches pela ajuda na coleta dos exames sorológicos.
- ✓ Ao Prof. Dr. José Antonio Cordeiro pela excelente ajuda nas análises estatísticas.
- ✓ Ao Prof. Dr. Celso Granato pela compreensão da urgência na realização dos exames sorológicos.
- ✓ À Profa. Dra. Maria Carmem Guimarães Possato pela revisão ortográfica.
- ✓ À Zélia e todo o pessoal da biblioteca pelo socorro constante na obtenção das referências bibliográficas.
- ✓ Ao Setor de Pós-Graduação do INCOR-USP, nas pessoas da Sra. Neuza, Juliana e Eva, pela orientação sempre necessária.
- ✓ À minha amiga Fabiana Cristina Godoy por todo apoio e ajuda na redação deste trabalho.
- ✓ À tradutora Lívia Cais Burdmann.
- ✓ À FAPESP pela ajuda financeira na realização dos exames sorológicos.
- ✓ Ao Celso Pereira Reis Filho pelo auxílio na solicitação da verba da FAPESP.

- ✓ À secretária da Disciplina Daniela Camilo.
- ✓ Aos pacientes que participaram deste trabalho.
- ✓ Aos meus colegas da Disciplina, pela colaboração na realização deste trabalho.
- ✓ Aos meus amigos da Unidade Coronária do Hospital de Base.
- ✓ A todos meus amigos da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto.

SUMÁRIO

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS

RESUMO

I - INTRODUÇÃO

1. AGENTES INFECCIOSOS E ATEROSCLEROSE	1
2. CLAMIDIA E DOENÇA ARTERIAL CORONÁRIA	2
2.1. Características da <i>Chlamydia pneumoniae</i>	2
2.2. Estudos soroepidemiológicos	4
2.3. Estudos histopatológicos	5
2.4. Estudos clínicos	6
3. MICOPLASMA E DOENÇA ARTERIAL CORONÁRIA	8

II - MÉTODOS	11
II.a. CASUÍSTICA	11
II.b. MÉTODOS	12
1. OBJETIVOS	12
1.1. Objetivo Primário	12
1.2. Análises Secundárias	12
2. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO	13
2.1. Critérios de Inclusão	13
2.2. Critérios de Exclusão	15
3. DEFINIÇÕES	15
3.1. Classificação dos quatro grupos do estudo	15
3.2. Doença Terminal	16
3.3. Infecção Ativa	16
4. PLANEJAMENTO DO ESTUDO	16
5. METODOLOGIA DA COLETA SANGUÍNEA	16
6. EXAMES LABORATORIAIS	17
6.1. Técnica para realização da sorologia para Clamidia ⁴⁹	17
6.2. Técnica para realização da sorologia para Micoplasma ⁵⁰	19

7. COLETA DE DADOS	20
8. SEGUIMENTO DOS PACIENTES	21
9. ANÁLISE ESTATÍSTICA	22
9.1. Tamanho Amostral	22
9.2. Testes estatísticos utilizados	22
III- RESULTADOS	24
1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS PACIENTES	25
2. OBJETIVO PRINCIPAL DO ESTUDO	29
3. COMPARAÇÃO DOS VALORES SOROLÓGICOS REALIZADOS NO INÍCIO DO ESTUDO ENTRE OS QUATRO GRUPOS ANALISADOS	31
4. ANÁLISES SECUNDÁRIAS	33
4.1. Correlação entre níveis sorológicos anti-Clamidia e anti-Mycoplasma e morbi-mortalidade em seis meses	33
4.2. Análise de subgrupos	34
IV- DISCUSSÃO	37
1. CRITÉRIOS PARA ESCOLHA DA POPULAÇÃO	37
2. PLANEJAMENTO DO ESTUDO	38
3. ESCOLHA DA TÉCNICA SOROLÓGICA	39
4. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS PACIENTES	40
5. OBJETIVO PRINCIPAL	41
6. ANÁLISES SECUNDÁRIAS	48
7. LIMITAÇÕES DO ESTUDO	48
V- CONCLUSÕES	50
1. OBJETIVO PRINCIPAL	50
2. ANÁLISES SECUNDÁRIAS	50
VI- ABSTRACT	51
VII-ANEXOS	53
ANEXO A - QUESTIONÁRIO UTILIZADO NA COLETA DE DADOS	53
ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS -INFORMAÇÃO	57
VIII- REFERÊNCIAS	61

LISTAS de TABELAS

Lista de Tabelas

Tabelas	Página
Tabela I- Características clínicas dos pacientes	26
Tabela II - Níveis sorológicos anti-Clamidia ao longo do tempo nos pacientes portadores de SIMI com e sem supra ST	29
Tabela III - Níveis sorológicos anti-Micoplasma ao longo do tempo nos pacientes portadores de SIMI com e sem supra ST	30
Tabela IV- Valores sorológicos entre os diferentes grupos avaliados	31
Tabela V - Grupo <i>Versus</i> Grupo	33
Tabela VI- Análise dos subgrupos idade < 65 e > 65 anos em relação aos valores sorológicos realizados no início do estudo	35
Tabela VII- Análise dos subgrupos masculino e feminino em relação aos valores sorológicos realizados no início do estudo	36

LISTAS de ABREVIATURAS e ACRÔNIMOS

Lista de Abreviaturas

Palavras ou termos	Abreviatura	Página
<i>Chlamydia Pneumoniae</i>	Clamidia	2
Infarto agudo do miocárdio	IAM	2
Acidente vascular cerebral	AVC	2
“Complexo Principal de Histocompatibilidade”	MHC	3
Doença Arterial Coronária	DAC	4
Reação em Cadeia da Polimerase	PCR	6
<i>Mycoplasma Pneumoniae</i>	Micoplasma	8
Síndromes Isquêmicas Miocárdicas Instáveis	SIMI	13
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa	CAPPesq	16
Antígeno–Anticorpo	Ag-Ac	17
Fosfato de Sódio Tamponado	PBS	18

Lista de Acrônimos

Palavras ou termos	Acrônimo	Página
<i>“Randomised trial of roxithromycin in non-Q-wave coronary syndromes”</i>	ROXIS	7
<i>“Azithromycin and Coronary Events Study”</i>	ACES	7
<i>“Pravastatin or Atorvastatin Evaluation and Infection Therapy”</i>	PROVE-IT TIMI	8
<i>“The Global Registry Of Acute Coronary Events”</i>	GRACE	41

RESUMO

RESUMO

Introdução: recente estudo brasileiro detectou a presença concomitante do *Mycoplasma pneumoniae* e *Chlamydia pneumoniae* em lesões ateromatosas coronárias estáveis e instáveis. O objetivo do presente estudo foi testar a associação entre títulos sorológicos de anticorpos anti-*Chlamydia pneumoniae* e anti-*Mycoplasma pneumoniae* e as Síndromes Isquêmicas Miocárdicas Instáveis.

Métodos: foram incluídos de forma prospectiva, 138 pacientes divididos em 4 grupos: 34 pacientes com Síndrome Isquêmica Miocárdica Instável com supradesnível do segmento ST, 40 pacientes com Síndrome Isquêmica Miocárdica Instável sem supradesnível ST, 30 pacientes com aterosclerose crônica assintomática e 34 doadores de sangue sem doença coronária conhecida. Nos dois primeiros grupos, as amostras sorológicas foram colhidas durante o evento agudo e com seis meses de seguimento, enquanto nos outros dois (aterosclerose crônica e controle) as mesmas foram colhidas uma única vez. Em todas as amostras foram dosados anticorpos da classe IgG anti-*Chlamydia pneumoniae* e anti-*Mycoplasma pneumoniae* utilizando a técnica de imunofluorescência indireta..

Resultados: seis meses após a internação, os pacientes com síndrome isquêmica miocárdica instável com supradesnível ST apresentaram significativa redução dos títulos sorológicos, em relação às sorologias colhidas durante o evento coronário agudo, o que ocorreu tanto com a *chlamydia* ($307,5 \pm 47,5$ versus $650 \pm 115,7$ $p=0,0001$) quanto com o *mycoplasma* ($21,5 \pm 3,5$ versus $36,5 \pm 5$ $p=0,0004$). O grupo sem supradesnível ST não teve variação significativa dos níveis sorológicos em seis meses de seguimento ($522,6 \pm 102,7$ versus $576 \pm 84,1$ $p=0,27$) para *chlamydia* e $27,6 \pm 5,8$ versus $27,6 \pm 5,8$ $p > 0,99$ para *mycoplasma*. Foi realizada também uma comparação entre os níveis sorológicos de todos os grupos analisados, e observou-se que os grupos com síndrome isquêmica

miocárdica instável (com e sem supra ST), tiveram valores sorológicos mais elevados do que os grupos aterosclerose crônica e controle, mas as diferenças não foram significativas. Os valores para *chlamydia* foram: $650 \pm 115,7$ (com supra), 576 ± 84 (sem supra), $373,3 \pm 65$ (aterosclerose crônica) e $343,5 \pm 57,2$ (controle), $p=0,083$; e os valores para *mycoplasma* foram: $36,5 \pm 5$ (com supra), $27,6 \pm 5,8$ (sem supra), $23 \pm 4,3$ (aterosclerose crônica) e $26,7 \pm 3,3$ (controle), $p=0,171$.

Conclusões: o presente estudo demonstra associação entre títulos de anticorpos anti-*Chlamydia pneumoniae* e anti-*Mycoplasma pneumoniae* e a instabilização da placa coronária. Demonstra ainda a normalização dos mesmos títulos em um período de até seis meses, a partir do quadro agudo.

INTRODUÇÃO

I – INTRODUÇÃO

A aterosclerose é uma doença multifatorial complexa em que fatores de risco, tais como, hipercolesterolemia, tabagismo, hipertensão arterial, diabetes melito, obesidade, entre outros, já foram identificados e amplamente comprovados.

Do ponto de vista patológico, a aterosclerose envolve lesão, inflamação, infiltração, degeneração e trombose, além da participação de uma resposta inflamatória local e sistêmica já identificada e documentada.

Entretanto, muitos aspectos da etiopatogenia da aterosclerose permanecem não completamente compreendidos¹. Muitos autores levantaram a hipótese de que um agente infeccioso, diretamente ou indiretamente, seria o gatilho para uma cascata de reações biológicas e bioquímicas que atuaria na instalação, progressão e instabilização da placa aterosclerótica¹⁻³.

1. Agentes Infecciosos e Aterosclerose

Em 1978, foi demonstrado que galinhas infectadas com *Herpesvírus avium* desenvolviam lesões vasculares semelhantes àsquelas encontradas na aterosclerose humana⁴. Desde então, uma série de agentes infecciosos foram investigados, tais como *Helicobacter pylori*, Citomegalovírus, *Adenovirus*, *Herpes simplex*, sem que se conseguisse demonstrar ligação entre esses agentes e a doença aterosclerótica^{5,6}.

No entanto, estudos que avaliaram a *Chlamydia pneumoniae* (Clamidia) mostraram fortes evidências da sua participação na doença aterosclerótica estável, infarto agudo do miocárdio (IAM) e acidente vascular cerebral (AVC)⁷⁻¹²

2. Clamidia e Doença Arterial Coronária

2.1. Características da Clamidia

Clamidia é uma bactéria gram-negativa intracelular obrigatória, que possui antígenos grupos-específicos compostos por lipopolissacárides e antígeno espécie específica protéico.

Uma importante característica biológica da infecção por esse agente consiste no equilíbrio quase sempre atingido entre hospedeiro e parasita, resultando na persistência prolongada da infecção.

Muitas evidências sugerem que a Clamidia poderia entrar na circulação e permanecer durante anos na parede dos vasos sangüíneos em diversos locais, induzindo a inflamação e reação imunológica que lesariam os vasos e levariam ao ataque cardíaco e ao AVC. O hospedeiro infectado produz anticorpos que exercem pouco efeito protetor contra a reinfecção^{13,14}.

Essa persistência prolongada se deve a características próprias da Clamidia e sua capacidade de “enganar” o sistema imune.

Normalmente, um patógeno, ao entrar na célula epitelial, fica confinado no interior de um vacúolo. A destruição desse patógeno ocorrerá quando uma organela transportadora de enzimas capazes de lisar proteínas, lipídios, entre outros, (lisossomo) se fundir a ele.

Dessa lise, fragmentos da proteína (determinantes antigênicos) são transportados e exibidos pelas proteínas chamadas “complexo principal de histocompatibilidade” (MHC), presentes na superfície das células, denominados MHC de Classe I para os parasitas intracelulares, e MHC de Classe II para os extracelulares.

Os linfócitos TCD4 e TCD8 (auxiliares e citotóxicos), cuja função primordial é “**patrulhar**” todo o organismo, ligam-se às moléculas de MHC e, se receberem a informação de que a célula está infectada, imediatamente organizam um “ataque” contra essas células.

A Clamídia consegue impedir que o vacúolo que a abriga se funda ao lisossomo para digeri-la e, assim, impede a expressão dos antígenos de histocompatibilidade da Classe I, tão necessários para a resposta imune.

Dessa forma, as bactérias proliferam livremente, enquanto estão separadas fisicamente do resto da célula infectada^{15,16}.

A Clamídia é identificada como o terceiro agente infeccioso mais comum na etiologia da sinusite, bronquite e pneumonia comunitária. Estudos de prevalência demonstraram que mais de 50% da população adulta, dos mais diferentes países, já foi exposta a esse agente infeccioso pelo menos uma vez na vida¹⁷.

Por outro lado, publicações sugerem que a Clamídia possa participar do processo de instabilização da placa de ateroma por um mecanismo auto-imune. Ficou demonstrado que, durante infecção crônica e persistente, este agente produz grande quantidade de uma proteína denominada HSP-60 (“proteína de choque térmico”), que pode estimular o macrófago a produzir

citocinas pro - inflamatórias, consideradas importantes para o desenvolvimento da aterosclerose e suas complicações^{18,19}.

Recentemente, comprovou-se que a *Clamidia* pode induzir uma superprodução de HSP-60 humana pelas células infectadas, levando a uma resposta imune entre as HSPs, promovendo, assim, uma reação auto-imune. Esse processo, conhecido como mimetismo molecular, pode ter um importante papel no desencadeamento das lesões ateroscleróticas^{20,21}.

Importante salientar que alguns autores questionam a participação do processo auto-imune e ressaltam o papel direto do agente infeccioso na etiopatogenia da doença aterosclerótica humana.

2.2. Estudos Soroepidemiológicos

A primeira ligação entre *Clamidia* e aterosclerose veio dos estudos soroepidemiológicos desenvolvidos na Finlândia por Saikku e cols⁷. Na primeira publicação, de 1988, esses pesquisadores demonstraram que pessoas com doença arterial coronária (DAC) comprovada tiveram uma chance significativamente maior de apresentarem anticorpos Anti-*Clamidia* das classes IgM e IgG, quando comparados a indivíduos saudáveis.

Em 1992, o mesmo grupo publicou o "*Helsinki Heart Study*"⁹, cujo objetivo principal foi testar a eficácia do genfibrozil na prevenção da doença coronariana. Como desfecho secundário, foram dosados anticorpos Anti-*Clamidia* e imunocomplexos circulantes contendo polissacáride clamidial, buscando correlacionar ativação de infecção crônica latente pela *Clamidia* e desenvolvimento de DAC. Essa publicação demonstrou que a infecção prévia

por esse agente infeccioso, indicada pela presença de títulos elevados de Anticorpos e imunocomplexos, foi um fator de risco independente para eventos coronarianos agudos.

Posteriormente, vários estudos demonstraram associação entre soropositividade para Clamidia e aterosclerose, em artérias carótidas ou nas coronárias^{8,9}.

No entanto, o valor preditivo desses achados foi limitado, em parte pelo fato de muitos desses estudos serem retrospectivos, e também devido ao alto nível de exposição a esse agente infeccioso, fazendo com que, na população adulta, os anticorpos anti-Clamidia sejam encontrados em mais de 50% dos casos^{17,22}.

Estudo prospectivo desenvolvido por Fageberg e cols. mostrou associação entre títulos elevados de Anticorpos anti-Clamidia e aumento do risco de futuros eventos cardiovasculares²³, o que não foi corroborado por Ridker e cols, levando em conta especificamente risco de infarto agudo do miocárdio²⁴.

Um estudo mais recente sobre o assunto, analisando militares jovens (entre 30 e 50 anos) demonstrou associação significativa entre infecção por Clamidia e IAM, chamando a atenção sobre a importância do tempo de exposição ao agente infeccioso²⁵.

2.3. Estudos Histopatológicos

A presença do anticorpo anti-Clamidia significa que, em algum momento, o seu portador entrou em contato com o patógeno e desenvolveu uma resposta

imune, mas não revela se a *Clamidia* ainda está presente, e como está interagindo com o organismo do hospedeiro.

Por conta disso, a partir do início dos anos 90, diversos pesquisadores passaram a procurar evidências diretas da *Clamidia* e de outros agentes infecciosos em vasos sanguíneos e tecidos (saudáveis ou com comprometimento aterosclerótico), por meio de diversas técnicas: reação em cadeia da polimerase (PCR), imunohistoquímica, microscopia eletrônica e cultura.

Inicialmente, as pesquisas conseguiram demonstrar a presença de material genético ou partes da *Clamidia* em placas ateroscleróticas nas artérias coronárias^{26,27} e carótidas²⁸. Esses resultados foram confirmados por outras publicações, que detectaram a presença do antígeno bacteriano em aorta e coronárias²⁹⁻³¹.

Contudo, a recuperação de organismos ainda viáveis e metabolicamente ativos de placas ateroscleróticas por meio de cultura não tem sido bem sucedida³². Além disso, nem sempre a presença comprovada da *Clamidia* foi acompanhada por positividade sorológica, embora o resultado de uma metanálise com mais de vinte estudos tenha sugerido a existência dessa relação³³.

2.4. Estudos Clínicos

Os dados provenientes dos estudos soroepidemiológicos e histopatológicos levaram diversos pesquisadores à decisão de avaliar se antibióticos com ação anti-clamidal poderiam prevenir ou reduzir eventos isquêmicos em pacientes com doença arterial coronária.

Um estudo clínico de Gupta *et cols* tratou sessenta sobreviventes de infarto do miocárdio com azitromicina por um curto período, e conseguiu a redução de alguns marcadores de inflamação e do título de Anticorpos anti-Clamidia³⁴.

Neste mesmo ano, o estudo piloto ROXIS (*“Randomised trial of roxithromycin in non-Q-wave coronary syndromes”*)³⁵, utilizando a roxitromicina, um antibiótico macrolídeo com evidente atividade anti-clamidal, demonstrou redução significativa de eventos cardíacos no grupo tratado em relação ao placebo.

Diversos estudos que se seguiram, apesar de algumas vezes comprovarem redução de marcadores de inflamação ou de títulos de Anticorpos anti-Clamidia, não conseguiram demonstrar redução de eventos clínicos³⁶⁻³⁸.

Recentemente, dois grandes estudos (ACES³⁹ e PROVE-IT⁴⁰) cuidadosamente planejados para evitar as limitações dos anteriores, incluíram adequado tamanho amostral e maior tempo de duração do tratamento com antibióticos de comprovada ação anti-Clamidia, mas ambos não conseguiram demonstrar vantagens na utilização desses agentes.

O estudo *“Azithromycin and Coronary Events Study”* (ACES)³⁹ randomizou 4012 pacientes com DAC para dose semanal de azitromicina ou placebo durante um ano, e os pacientes foram seguidos por mais três anos. O objetivo primário composto foi morte por DAC, infarto não fatal, hospitalização por angina instável ou revascularização coronária. Não houve diferença entre os

dois grupos e os autores concluíram que a azitromicina foi ineficaz na prevenção secundária de eventos cardiovasculares.

O “*Pravastatin or Atorvastatin Evaluation and Infection Therapy*” (PROVE-IT TIMI)⁴⁰, estudo fatorial 2x2, incluiu 4162 pacientes com DAC randomizados para receber gatifloxacina ou placebo 10 dias por mês durante 18 a 32 meses. O objetivo primário composto foi morte por qualquer causa, infarto do miocárdio, hospitalização por angina instável, revascularização coronária ou acidente vascular cerebral. Ao final, demonstrou-se uma redução de 5% de eventos cardiovasculares, a favor do grupo tratado, mas essa diferença não foi estatisticamente significativa.

2.5. *Mycoplasma pneumoniae* e Doença Arterial Coronária

As evidências científicas correlacionando *Mycoplasma Pneumoniae* (Micoplasma) com doença arterial coronária, são bastante menos numerosas do que as descritas anteriormente para Clamídia.

Higuchi e cols, em peças de necropsia de três pacientes que morreram em decorrência de IAM, encontraram uma quantidade significativamente aumentada de células infectadas pela Clamídia em placas ateroscleróticas rotas, quando comparadas a placas estáveis. Além disso, por microscopia eletrônica, demonstraram que a bactéria intacta e seus fragmentos estavam presentes principalmente na adventícia, e que o grau de inflamação estava associado ao número de células parasitadas. Estes dados sugeriam fortemente que a Clamídia estava diretamente envolvida no desenvolvimento da

inflamação da placa e da adventícia, que levaram a um quadro histológico de pan-arterite⁴¹.

Em uma análise mais detalhada, demonstrou-se a presença de um outro microorganismo associado à Clamidia e, por microscopia eletrônica, este foi identificado como *Mycoplasma Pneumoniae*⁴². Esse agente estava aderido à superfície endotelial da *vasa-vasorum* e ao citoplasma das células também infectadas pela Clamidia.

Além destes locais, o micoplasma foi detectado nos monócitos, macrófagos, interstício e dentro do ateroma, sempre associado à Clamidia. Posteriormente, a presença do Micoplasma foi confirmada pela técnica de hibridização “*in situ*”⁴³.

O Micoplasma é classificado como o menor e mais simples microorganismo conhecido; não possui parede celular externa e é um agente importante no desencadeamento de infecções respiratórias. Entre as suas várias propriedades, salienta-se a ativação de macrófagos e indução de citocinas, comportando-se ainda como super-antígeno⁴⁴.

Dentro do contexto ora em discussão, talvez a característica mais importante do Micoplasma seja o fato de este microorganismo necessitar da presença de colesterol para sua sobrevivência, uma vez que sua membrana é constituída dessa substância.

Importante destacar que tal característica é exclusiva do Micoplasma e talvez explique a presença do microorganismo no interior do centro lipídico da placa⁴⁴.

Esse agente infeccioso possui a capacidade de induzir liberação pelos macrófagos de citocinas, peróxido de hidrogênio e radicais superóxidos, o que poderia ser a causa da lesão na membrana celular do hospedeiro na qual ele se adere. Admite-se ainda que o *Micoplasma* seja o responsável pela oxidação dos lipídeos na placa e pela morte dos macrófagos⁴⁵.

Recentemente, alguns estudos avaliaram se a presença de vários agentes patógenos em um mesmo indivíduo, levando a uma eventual resposta sinérgica, poderia exacerbar o processo aterosclerótico, sendo demonstrada uma relação significativa entre o número de patógenos infecciosos ao qual o paciente foi exposto e a gravidade do processo aterosclerótico⁴⁶.

Essa linha de pesquisa tem como base o fato de vários microorganismos, atuando simultaneamente, induzirem o hospedeiro a sintetizar enormes quantidades de proteínas, o que resulta em uma resposta imune exacerbada por mimetismo molecular.

Zhu e cols demonstraram que a “carga de infecções” foi um fator de risco independente para óbito de causas cardiovasculares em pacientes com DAC⁴⁷.

A hipótese a ser testada, no presente estudo, é se a presença simultânea do *Micoplasma* e *Clamidia* teria as suas ações potencializadas, predispondo, assim, à instabilização da placa de ateroma.

Assim, o estudo foi planejado para avaliar o papel desses dois agentes bacterianos no desencadeamento de eventos isquêmicos coronários, por meio de investigação sorológica.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

II – MÉTODOS

II.a. CASUÍSTICA

Durante o período de março de 2002 a novembro de 2004, foram incluídos, de forma prospectiva:

- 1) 34 pacientes portadores de IAM com supradesnível do segmento ST, com idade média de $55,1 \pm 1,7$ anos, sendo 73,53% do sexo masculino.
- 2) 40 pacientes portadores de angina instável ou IAM sem supradesnível do segmento ST, com idade média de $60,1 \pm 2,1$ anos, sendo 52,50% do sexo masculino.
- 3) 30 pacientes portadores de aterosclerose crônica, assintomáticos, com idade média de $65,9 \pm 2,0$ anos, sendo 63,33% do sexo masculino.
- 4) 34 indivíduos sem doença coronariana conhecida, selecionados do grupo de doadores de sangue do Hemocentro do Hospital de Base, com idade média de $42,5 \pm 1,2$ anos, sendo 64,71% do sexo masculino.

Todos os pacientes e o grupo controle foram provenientes do Hospital de Base da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto.

II.b. MÉTODOS

1-OBJETIVOS

1.1. Objetivo Primário

O objetivo principal do estudo foi testar a associação entre títulos sorológicos de anticorpos anti-Clamidia e anti-Mycoplasma, e Síndromes Isquêmicas Miocárdicas Instáveis.

1.2. Análises Secundárias

- a) Correlação entre níveis sorológicos anti-Clamidia e anti-Mycoplasma e o desfecho composto de óbito por qualquer causa, nova angina necessitando de internação hospitalar e reinfarto que ocorrerem em até seis meses após a alta hospitalar, nos pacientes com as formas agudas da doença arterial coronária.
- b) Avaliação da resposta sorológica anti-Clamidia e anti-Mycoplasma nos seguintes subgrupos:
 - Idade (≥ 65 e < 65 anos)
 - Sexo masculino ou feminino

2. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

2.1. Critérios de Inclusão

Foram incluídos, no presente estudo, pacientes de ambos os sexos com idade acima de 18 anos que apresentassem os critérios de definição dos diferentes grupos, como se segue:

a) Grupo SIMI com Supradesnível do Segmento ST

Foram incluídos neste grupo pacientes com Síndrome Isquêmica Miocárdica Instável (SIMI)⁴⁸ com supradesnível do segmento ST ≤ 24 horas de evolução. Os pacientes deste grupo preencheram pelo menos dois dos seguintes critérios de IAM:

- **Clínicos:** dor retroesternal de forte intensidade e caráter opressivo, com duração superior a 20 minutos, que não cedeu com o uso de nitratos;
- **Eletrocardiográficos:** supradesnível do segmento ST ≥ 1 mm em pelo menos duas derivações periféricas e/ou supradesnível do segmento ST ≥ 2 mm em pelo menos duas derivações consecutivas precordiais e/ou presença de bloqueio de ramo esquerdo;
- **Marcadores de Necrose Miocárdica:** elevação de pelo menos duas vezes em relação aos valores normais da CKMB (normal até 25U/l) e/ou Troponina T (normal até 0,010 ng/ml).

b) Grupo SIMI sem Supradesnível do Segmento ST

Foram incluídos neste grupo pacientes com SIMI sem supradesnível do segmento ST ≤ 24 horas de evolução utilizando as seguintes definições:

- Angina instável: quando os biomarcadores de necrose miocárdicas estavam normais.
- IAM sem supradesnível do segmento ST: quando os biomarcadores estavam elevados (CKMB e/ou Troponina T).

c) Grupo aterosclerose crônica

Foram incluídos neste grupo pacientes com doença aterosclerótica coronária crônica, assintomáticos ou com angina estável. A presença da doença foi definida pelos seguintes critérios:

- IAM prévio; e/ou;
- Revascularização cirúrgica do miocárdio prévia; e/ou;
- Intervenção coronária percutânea prévia (ICP); e/ou;
- Cineangiocoronariografia prévia demonstrando lesões obstrutivas de artérias coronárias.

d) Grupo controle

Foram incluídos neste grupo indivíduos sem doença aterosclerótica conhecida, selecionados de lista de doadores de sangue do hospital.

2.2. Critérios de Exclusão

Foram excluídos do estudo os pacientes que apresentaram pelo menos um dos seguintes critérios:

- Condições/circunstâncias que pudessem resultar em dificuldade de compreensão do consentimento informado (doença psiquiátrica, dependência de álcool ou drogas, retardo mental);
- Recusa do paciente em assinar o consentimento informado;
- Impossibilidade de retornar no período determinado para coleta de sangue destinada ao exame de seguimento;
- Idade inferior a 18 anos;
- Tempo de evolução > 24 horas (nos grupos agudos);
- Infecção ativa;
- Uso de antimicrobianos nos últimos 30 dias;
- Doenças terminais.

3. DEFINIÇÕES

3.1. As condições abaixo relacionadas, utilizadas na classificação dos quatro grupos do estudo foram definidas nos critérios de inclusão (*páginas 13 e 14*):

- a) IAM com supradesnível do segmento ST
- b) Angina instável

- c) IAM sem supradesnível do segmento ST
- d) Doença aterosclerótica coronária crônica
- e) Grupo controle

3.2. Doença Terminal

Foi definida como qualquer doença grave que limitasse significativamente a expectativa de vida do paciente por menos de seis meses.

3.3. Infecção Ativa

Foi considerado como infecção ativa qualquer quadro clínico compatível com síndrome infecciosa, tais como febre e/ou sintomas gerais e/ou presença de alterações laboratoriais, como alteração do número de leucócitos e/ou alterações nos marcadores de atividade inflamatória.

4. PLANEJAMENTO DO ESTUDO

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto e também pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Universidade de São Paulo.

Todos os pacientes assinaram o termo de consentimento informado (ver Anexo 2).

5. METODOLOGIA DA COLETA SANGUÍNEA

Nos pacientes portadores de SIMI com e sem supra ST, as amostras sorológicas foram colhidas em duas ocasiões, a primeira durante o evento agudo e a segunda seis meses após. Nos outros dois grupos (aterosclerose

crônica e controle), as colheitas sanguíneas foram realizadas uma única vez. Em todas as coletas, para todos os grupos, foram dosados os títulos de anticorpos anti-Clamidia e anti-Micoplasma da classe IgG.

Cada amostra sanguínea foi de 10 ml de sangue, colhida em tubos Vacutainer SST-GEL, e submetida à centrifugação por 10 minutos a 3.000 RPM. O soro obtido dessa forma foi estocado em freezer regulado para temperatura de menos 20°C.

6. EXAMES LABORATORIAIS

Os exames sorológicos para pesquisa dos anticorpos IgG anti-Clamidia e anti-Micoplasma foram realizados no Laboratório Fleury, por um único examinador, utilizando a técnica de imunofluorescência indireta⁴⁹. Os demais exames foram realizados pelo Laboratório Central do Hospital de Base da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto.

6.1. Técnica para realização da sorologia para Clamidia ⁴⁹

Imunofluorescência Indireta

a) Inicialmente foi realizada uma reação em duas etapas. Na primeira, a amostra foi colocada em contato com o substrato, para que os anticorpos (Ac) específicos, presentes no soro, se ligassem ao antígeno, formando o complexo Antígeno–Anticorpo (Ag-Ac). Os componentes séricos não ligados foram removidos durante a lavagem. Na segunda etapa, o complexo Ag–Ac específico, formado na primeira etapa, foi revelado por uma anti-

gamaglobulina humana, IgG, marcado com isotiocianato de fluoresceína. A reação foi lida em microscópio de fluorescência com aumento de 400 vezes.

b) A reação foi preparada numa lâmina com 12 pocinhos. Cada pocinho continha uma mistura de células infectadas e não infectadas pela *Chlamidia* (cepa CDC).

c) Foi acrescentado conjugados anti-IgG humanos marcados com fluoresceína.

d) Foram utilizados soros controles positivos e negativos.

e) Foi acrescentado RF absorbent da Behring, para evitar interferência de excesso de IgG.

f) Foi feita diluição das amostras para pesquisa de anticorpos IgG, a partir de 1/80 até 1/5120.

Reação para pesquisa de IgG

a) Pipetou-se aproximadamente 20 µl das diluições, 1/80 das amostras e controles, fazendo-se diluições crescentes da titulação.

b) Incubou-se por 30 ± 2 minutos a $37 \pm 2^\circ\text{C}$, em câmara úmida.

c) Retiraram-se as lâminas da estufa, enxaguando-as rápida e delicadamente com pisseta contendo PBS (fosfato de sódio tamponado). O jato foi dirigido para as bordas das lâminas que, a seguir, foram lavadas duas vezes por 10 minutos, em cuba contendo PBS.

d) Pipetou-se aproximadamente 20 µl do conjugado anti-IgG em cada divisão das lâminas.

e) Incubou-se durante 30 ± 2 minutos a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ em câmara úmida.

f) A leitura foi realizada em microscópio de fluorescência com objetiva de 40 vezes e ocular de 10 vezes (aumento de 400 vezes). As leituras foram registradas no caderno e depois transferidas para a lista de trabalho.

g) Os resultados dos controles foram marcados no programa de controle de qualidade.

A reação foi considerada POSITIVA, pela presença de fluorescência verde maçã brilhante nas inclusões de Clamidia, presentes nas células infectadas com intensidade maior que 1+.

Nas reações quantitativas, o título foi dado pela maior diluição do soro que apresentasse intensidade de fluorescência de 1+.

6.2 . Sorologia para Micoplasma ⁵⁰

Imunofluorescência Indireta

a) A cepa do Micoplasma foi cultivada em meio de Hayflick por 10 a 14 dias. As microcolônias produzidas foram lavadas com PBS em pH 7,2, re-suspendidas em 2 a 4 ml de PBS e 10 µl distribuídas em cada poço de uma lâmina recoberta por teflon de 12 poços.

b) As lâminas foram secadas em ar ambiente antes de fixadas em acetona por 10 minutos. As lâminas fixadas foram armazenadas a – 20°C, com vida útil de três meses.

c) As amostras de soro foram diluídas em PBS, pH 7,2 e inativadas com calor a 56°C por 30 minutos. Colocou-se 20 µl de cada diluição de soro tratado em um

poço designado da lâmina de Micoplasma, e soros conhecidos positivos e negativos para Micoplasma foram também testados em cada lote.

d) As lâminas foram incubadas por três horas a 37°C e lavadas três vezes por 10 minutos em PBS, pH 7,2.

e) Foi adicionada, em cada poço, fluoresceína conjugada com IgG anti-humano, obtida de carneiro, diluída para 100 em PBS pH 7,2, contendo 1:5.000 de azul de Evan.

f) As lâminas foram incubadas por mais uma hora a 37°C, lavadas duas vezes em PBS e uma vez em tampão fosfato pH 8,4, antes da montagem em 50% de tampão fosfato – glicerol pH 8,4.

g) As lâminas foram examinadas usando microscopia ultravioleta, para evidenciar a fluorescência específica.

h) As diluições foram feitas a partir de 1/10.

O título foi dado pela maior diluição do soro que apresentasse intensidade de fluorescência.

7. COLETA DE DADOS

Para todos os pacientes do estudo, foram anotados em ficha específica dados de identificação, idade e sexo.

Excetuando-se os pacientes do grupo controle, foram colhidos também os seguintes dados (Anexo 1).

7.1. Diagnóstico inicial na emergência;

7.2. Eletrocardiograma;

- 7.3. Marcadores de necrose miocárdica (CKMB e/ou Troponina T), considerando-se os valores de pico;
- 7.4. Antecedentes pessoais e familiares;
- 7.5. Uso prévio de medicamentos;
- 7.6. Medicamentos utilizados durante a internação;
- 7.7. Evolução (alta ou óbito);
- 7.8. Tipo de procedimento realizado (tratamento clínico, intervenção percutânea coronária ou revascularização do miocárdio);
- 7.9. Medicamentos por ocasião da alta;
- 7.10. Tempo de hospitalização.

8. SEGUIMENTO DOS PACIENTES

Os pacientes portadores de SIMI com ou sem supra do segmento ST foram reavaliados seis meses após a internação.

Neste retorno, além da coleta de sangue para a realização da segunda sorologia anti-Clamidia e anti-Micoplasma, foi registrado a ocorrência de quaisquer dos seguintes novos eventos: internações, infarto, reinfarto, necessidade de intervenção percutânea coronária ou cirurgia de revascularização miocárdica e óbito por qualquer causa.

Foi considerada perda de seguimento depois que todas as tentativas de contato com o paciente se esgotaram.

9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

9.1. Tamanho Amostral

Como não havia informação a priori do comportamento dos valores das sorologias anti-Clamidia e anti-Mycoplasma, e dadas as características de estudo piloto da presente pesquisa, optou-se por tamanhos amostrais de pelo menos 30 pacientes em cada grupo.

No caso dos grupos com SIMI, da mesma forma exigiu-se mais do que 30 pacientes com ambas as amostras sanguíneas coletadas.

9.2. Testes estatísticos utilizados

Os testes utilizados nas análises das características clínicas da população foram os testes do qui-quadrado de Pearson para associação entre variáveis categóricas e, quando o uso do mesmo não foi possível por problemas amostrais, foi aplicado o qui-quadrado por análise de dependência^{51,52}. Para variável contínua idade, foi usado inicialmente o teste de ANOVA, mas após a aplicação do método de Bartlett, verificou-se que havia significativa diferença no desvio padrão da idade entre os quatro grupos. Por esse motivo, foi realizado o teste ANOVA não paramétrico por meio do método de Kruskal-Wallis⁵³.

Os valores das sorologias anti-Clamidia e anti-Mycoplasma não tiveram distribuição Gaussiana, portanto utilizaram-se testes não paramétricos em todas as análises que envolveram valores sorológicos foram utilizadas

medianas e quartis para a realização dos testes estatísticos, porém para facilitar a compreensão e interpretação dos dados, optou-se por apresentar nas tabelas e gráficos, além das medianas e quartis, também as médias e respectivos erros-padrão.

Nas comparações entre os títulos sorológicos obtidos no momento da inclusão do paciente no estudo e os títulos sorológicos realizados seis meses após aplicou-se o teste de ranqueamento de Wilcoxon⁵³.

Nas múltiplas comparações entre títulos sorológicos dos quatro grupos, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis⁵³.

Para avaliação dos eventos clínicos foi realizada análise de regressão logística e nas análises de subgrupo foi usado o teste de Mann-Whitney⁵¹.

Nos intervalos de confiança utilizou-se o limite de 95%, e as diferenças foram consideradas significativas para $p \leq 0,05$ (bicaudal).

Os softwares utilizados para a análise estatística foram o GraphPad Instat v. 3.00 e Stats Direct Statistics Software v. 1.617.

RESULTADOS

III - RESULTADOS

Foram incluídos, no total, 138 pacientes, com idade média de $56,6 \pm 13,8$ anos, sendo 87 (63%) homens.

Como referido anteriormente, o tamanho da amostra recomendado para análise sorológica foi de 30 pacientes por grupo, totalizando 120 pacientes. No decorrer do estudo, oito pacientes faleceram, sendo dois do grupo SIMI com supra ST e seis do grupo SIMI sem supra ST. Quatro pacientes do grupo SIMI sem supra ST não compareceram aos retornos pré-agendados. Após várias tentativas mal sucedidas de contato, foram considerados como perda de seguimento e, portanto, nesses casos, não foi possível colher a segunda sorologia.

Essas perdas foram repostas, tendo sido incluídos no total 138 pacientes: 34 no grupo SIMI com supra ST; 40 pacientes no grupo SIMI sem supra ST; 30 pacientes no grupo aterosclerose crônica e 34 indivíduos no grupo controle.

Este cuidado assegurou que todos os grupos alcançassem o tamanho recomendado da amostra (mínimo de 30 pacientes por grupo) e, ao final do estudo, 126 pacientes realizaram todos os exames sorológicos: 32 no grupo SIMI com supra ST; 30 pacientes no grupo SIMI sem supra ST; 30 pacientes no grupo aterosclerose crônica e 34 indivíduos no grupo controle.

Apenas os pacientes que realizaram todas as sorologias planejadas para o seu grupo foram incluídos em todas as análises realizadas no estudo.

A causa dos óbitos foram as seguintes: choque cardiogênico (1 caso), morte súbita na residência (6 casos) e morte durante cirurgia para reconstrução da geometria do ventrículo esquerdo.

1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS PACIENTES

As características clínicas dos pacientes estão relacionadas na Tabela I, que se refere aos 126 pacientes que realizaram todas as sorologias planejadas para o seu grupo.

Como se pode notar, os grupos foram significativamente diferentes entre si, em relação às diversas variáveis. O grupo controle foi mais jovem ($42,5 \pm 1,2$ anos, $p < 0,0001$ no global); o grupo SIMI com supra foi significativamente mais jovem do que o grupo sem supra ($55,1 \pm 1,7$ *versus* $60,1 \pm 2,1$ anos, $p = 0,034$) e do que o grupo aterosclerose crônica ($55,1 \pm 1,7$ *versus* $65,9 \pm 2,0$ anos, $p < 0,0001$) e, finalmente o grupo SIMI sem supra foi significativamente mais jovem do que o grupo aterosclerose crônica ($60,1 \pm 2,1$ anos *versus* $65,9 \pm 2,0$ anos, $p = 0,032$). Não houve diferenças significativas quanto à distribuição dos sexos entre os quatro grupos, o que era esperado, já que os grupos controle foram pareados com os grupos agudos em relação a esse parâmetro. O grupo portador de aterosclerose crônica apresentou uma elevada incidência de fatores de risco (83,3% dos casos eram hipertensos, 53,3% eram tabagistas dos quais apenas 10% não abandonaram o fumo, e 90% apresentavam dislipidemia).

Página reservada para a tabela I que virá de outro arquivo

Levando-se em conta os 138 pacientes inicialmente incluídos no estudo, na análise das características clínicas dos grupos, o grupo controle continua sendo significativamente mais jovem (42,47; 7,02 anos), seguido do grupo SIMI com supra (56,21; 10,61 anos), grupo SIMI sem supra (62,08; 13,31 anos). Os pacientes portadores de aterosclerose crônica foram os mais idosos (65,87; 10,92 anos). Observa-se também, nesta análise, diferença significativa de idade quando se compara os quatro grupos simultaneamente ($p < 0.0001$).

Assim como ocorreu quando foram avaliados apenas os 126 pacientes que fizeram as duas sorologias, não houve diferenças significativas na prevalência de sexo masculino ($p=0,31$) entre os grupos SIMI com supra (73,53%), SIMI sem supra (52,50%), aterosclerose crônica (63,33%) e controles (64,71%).

Quanto aos antecedentes pessoais, assim como na análise dos 126 pacientes (Tabela I), o grupo portador de aterosclerose crônica apresentou maior prevalência de fatores de risco e comorbidades quando comparado aos demais grupos: a) hipertensão arterial 83,3% *versus* 50% do grupo SIMI com supra e 77,5% do grupo SIMI sem supra ($p= 0,008$); b) dislipidemia 80% *versus* 14,71% do grupo SIMI com supra e 15,0% do grupo SIMI sem supra ($p= 0,0005$). Já o tabagismo foi significativamente mais comum no grupo SIMI com supra (67,6%) em relação aos demais grupos (40,0% no grupo SIMI e 8% no grupo aterosclerose crônica ($p=0,01$). O grupo SIMI sem supra foi o que apresentou o maior número de pacientes com antecedente de angina (70%) contra 47% do grupo SIMI com supra e 26,6% do grupo aterosclerose crônica ($p= 0,001$). Um número significativamente maior de pacientes portadores de

aterosclerose crônica tinha antecedentes de procedimentos invasivos quando comparados aos outros grupos (ICP prévia 26,6% contra 11,7% do grupo SIMI com supra e 13,2% do grupo SIMI sem supra; $p=0,03$) e cirurgia de revascularização prévia (46,6% contra 5,8% do grupo SIMI com supra e 15,2% do grupo SIMI sem supra; $p=0,0002$).

2. OBJETIVO PRINCIPAL DO ESTUDO

Tabela II - Níveis sorológicos anti-Clamidia ao longo do tempo nos pacientes portadores de SIMI com e sem supra ST

CLAMIDIA

SIMI com Supra ST (n=32)						
	Média	EP	Q1	Q2	Q3	Valor P
Clamidia basal	650,0	115,7	200,0	320,0	1120,0	0,0001
Clamidia 2ª amostra	307,5	47,5	100,0	240,0	320,0	
SIMI sem Supra ST (n=30)						
	Média	EP	Q1	Q2	Q3	Valor P
Clamidia basal	576,0	84,1	140,0	640,0	800,0	0,2754
Clamidia 2ª amostra	522,7	102,7	80,0	320,0	640,0	

n= número; SIMI= síndrome isquêmica miocárdica instável; EP= erro padrão; Q1= quartil 25% ; Q2= quartil 50% (mediana); Q3= quartil 75%.

Tabela III - Níveis sorológicos anti-Micoplasma ao longo do tempo nos pacientes portadores de SIMI com e sem supra ST

MICOPLASMA

SIMI com Supra ST (n=32)						
	Média	EP	Q1	Q2	Q3	P
Clamidia basal	36,5	5,0	20,0	30,0	70,0	0,0004
Clamidia 2ª amostra	21,5	3,6	10,0	20,0	35,0	
SIMI sem Supra ST (n=30)						
	Média	EP	Q1	Q2	Q3	P
Clamidia basal	27,7	5,8	10,0	20,0	40,0	>0,9999
Clamidia 2ª amostra	27,7	5,7	10,0	20,0	40,0	

n= número; SIMI= síndrome isquêmica miocárdica instável; EP= erro padrão; Q1= quartil 25%; Q2= quartil 50% (mediana); Q3= quartil 75%.

As tabelas II e III comparam os valores das sorologias colhidas na fase aguda do evento coronário e seis meses após, nos grupos com e sem supra do segmento ST, sendo essa análise o objetivo principal do estudo.

Os pacientes portadores de SIMI com supra do segmento ST apresentaram significativa redução dos títulos sorológicos nas coletas realizadas seis meses após a internação, quando comparados às sorologias colhidas durante o evento coronário agudo, o que ocorreu tanto com a clamidia ($p=0,0001$) quanto com o micoplasma ($p=0,0004$). Não foi observado o mesmo comportamento sorológico no grupo sem supra do segmento ST; tanto a

Clamidia quanto o Micoplasma não encontraram variação significativa dos níveis sorológicos, comparando-se as coletas realizadas em seis meses com aquelas realizadas durante o evento coronário agudo ($p=0,27$ para clamidia e $0,99$ para micoplasma).

3. COMPARAÇÃO DOS VALORES SOROLÓGICOS REALIZADOS NO INÍCIO DO ESTUDO ENTRE OS QUATRO GRUPOS ANALISADOS

Tabela IV - Valores sorológicos entre os diferentes grupos avaliados

Sorologia Clamidia Basal						
	Média	EP	Q1	Q2	Q3	Valor p
SIMI com Supra (n= 32)	650,0	115,7	200,0	320,0	1120,0	0,0832
SIMI sem Supra (n= 30)	576,0	84,2	140,0	640,0	800,0	
Aterosclerose Crônica (n= 30)	373,3	65,0	80,0	240,0	640,0	
Grupo Controle (n= 34)	343,5	57,1	80,0	320,0	640,0	
Sorologia Micoplasma Basal						
	Média	EP	Q1	Q2	Q3	Valor p
SIMI com Supra (n= 32)	36,5	5,0	20,0	30,0	70,0	0,1715
SIMI sem Supra (n= 30)	27,6	5,8	10,0	20,0	40,0	
Aterosclerose Crônica (n= 30)	23,0	4,4	0,0	20,0	40,0	
Grupo Controle (n= 34)	26,7	3,3	10,0	20,0	40,0	

n= número; SIMI= síndrome isquêmica miocárdica instável; EP= erro padrão; Q1= quartil 25%; Q2= quartil 50% (mediana); Q3= quartil 75%.

A Tabela IV compara as diferenças de níveis sorológicos entre todos os grupos analisados. Para essas análises foram utilizadas somente as amostras coletadas na primeira fase do estudo, por serem as únicas que todos os grupos realizaram.

Notam-se, nos grupos que apresentaram isquemia miocárdica aguda (SIMI com e sem supra ST), valores sorológicos mais elevados quando comparados aos grupos que não tiveram evento agudo (aterosclerose crônica e controle), tanto em relação ao anti-Clamídia quanto ao anti-Micoplasma.

Entretanto, as diferenças entre os grupos não foram, no global, estatisticamente diferentes entre si, apesar da tendência ($p=0,083$) encontrada.

Por outro lado, nas análises dos grupos entre si (Tabela V), demonstra-se que, nos portadores de SIMI, os títulos de anticorpos anti-Clamídia foram significativamente mais elevados que nos indivíduos do grupo controle, o que ocorreu tanto nos pacientes com supra ($p=0,03$) quanto nos pacientes sem supra do segmento ST ($p=0,04$).

Além disso, os valores sorológicos anti-Micoplasma foram significativamente mais elevados no grupo SIMI com supra do que no grupo aterosclerose crônica ($p=0,03$). Nas comparações restantes, não ocorreram diferenças significativas entre os grupos.

Tabela V - Grupo Versus Grupo

Clamidia	Micoplasma
Com Supra <i>versus</i> Sem Supra P = 0,945	Com Supra <i>versus</i> Sem Supra P = 0,111
Com Supra <i>versus</i> Aterosclerose Cr P = 0,091	Com Supra <i>versus</i> Aterosclerose Cr P = 0,034
Com Supra <i>versus</i> Controle P = 0,031	Com Supra <i>versus</i> Controle P = 0,309
Sem Supra <i>versus</i> Aterosclerose Cr P = 0,110	Sem Supra <i>versus</i> Aterosclerose Cr P = 0,596
Sem Supra <i>versus</i> Controle P = 0,042	Sem Supra <i>versus</i> Controle P = 0,535
Aterosclerose Cr <i>versus</i> Controle P = 0,763	Aterosclerose Cr <i>versus</i> Controle P = 0,244

Cr = crônica

4. ANÁLISES SECUNDÁRIAS

4.1. Correlação entre níveis sorológicos anti-Clamidia e anti-Micoplasma e morbi-mortalidade em seis meses

Um dos objetivos secundários do estudo foi avaliar se havia correlação entre níveis sorológicos anti-Clamidia e anti-Micoplasma e morbi-mortalidade em até seis meses após a alta hospitalar, considerando-se todos os pacientes inicialmente incluídos nos grupos SIMI com e sem supra ST. Os eventos pré-determinados foram: a) mortalidade global; b) novo episódio de angina com reinternação e c) reinfarto.

Durante o período de seguimento, não houve nenhum caso de novo infarto ou reinfarto, portanto foi realizada apenas a análise de regressão logística para óbitos. No presente estudo, os valores sorológicos não foram preditores independentes de óbito, tanto em relação à clamídia ($p=0,81$), quanto em relação ao micoplasma ($p=0,98$).

4.2. Análise de subgrupos

O outro objetivo secundário do estudo foi avaliar a resposta sorológica anti-Clamídia e anti-Micoplasma nos seguintes subgrupos pré-especificados:

- a) Idade (≥ 65 e < 65 anos)
- b) Sexo

Para essas análises, foram considerados os 126 pacientes incluídos no estudo, independente dos grupos aos quais pertenciam sendo utilizadas as amostras coletadas no início do estudo.

Em relação à idade, todos os pacientes foram divididos em dois subgrupos (≥ 65 anos e < 65 anos), e comparados em relação aos valores sorológicos anti-Clamídia e anti-Micoplasma, conforme demonstrado na tabela VI.

Tabela VI - Análise dos subgrupos idade < 65 e $\geq$ 65 anos em relação aos valores sorológicos realizados no início do estudo

Subgrupo Idade – Sorologia Clamidia Basal						
	Média	EP	Q1	Q2	Q3	Valor p
< 65 anos (n= 88)	485,4	50,0	80,0	320,0	640,0	0,9480
≥ 65 anos (n= 38)	480,0	80,8	160,0	320,0	640,0	
Subgrupo Idade – Sorologia Micoplasma Basal						
	Média	EP	Q1	Q2	Q3	Valor p
< 65 anos (n= 88)	32,3	2,9	10,0	20,0	40,0	0,0713
≥ 65 anos (n= 38)	22,1	3,4	10,0	20,0	40,0	

n= número; SIMI= síndrome isquêmica miocárdica instável; EP= erro padrão; Q1= quartil 25%; Q2= quartil 50% (mediana); Q3= quartil 75%.

O mesmo tipo de análise foi realizado para sexo, sendo os pacientes divididos em subgrupos masculino e feminino, independente dos grupos iniciais aos quais pertenciam (Tabela VII).

Tabela VII - Análise dos subgrupos masculino e feminino em relação aos valores sorológicos realizados no início do estudo

Subgrupo Sexo – Sorologia Clamidia Basal						
	Média	EP	Q1	Q2	Q3	Valor p
Masculino (n= 82)	526,8	57,9	80,0	320,0	640,0	0,1718
Feminino (n= 44)	403,6	57,5	160,0	320,0	640,0	
Subgrupo Sexo – Sorologia Micoplasma Basal						
	Média	EP	Q1	Q2	Q3	Valor p
Masculino (n= 82)	31,4	3,0	17,5	20,0	40,0	0,0941
Feminino (n= 44)	23,8	3,4	10,0	20,0	40,0	

n= número; SIMI= síndrome isquêmica miocárdica instável; EP= erro padrão; Q1= quartil 25%; Q2= quartil 50% (mediana); Q3= quartil 75%.

Nas duas análises de subgrupo realizadas no estudo (idade **< 65 e $\geq$ 65 anos e sexo masculino e feminino**), não houve diferenças significativas entre esses parâmetros e os valores sorológicos realizados no início do estudo, tanto na sorologia anti-Chlamidia quanto na anti-Micoplasma.

DISCUSSÃO

IV - DISCUSSÃO

O presente estudo foi motivado, fundamentalmente, pela publicação, por Higuchi e cols, de um estudo brasileiro que detectou a presença concomitante do *Micoplasma* e da *Clamidia* em lesões ateromatosas coronárias estáveis e instáveis ⁴².

Uma vez que o *Micoplasma* associado à *Clamidia* foi detectado pela primeira vez em lesão aterosclerótica, tornava-se necessário investigar o perfil sorológico desses agentes infecciosos nas diferentes formas de apresentação da doença arterial coronária.

A hipótese investigada foi se o *Micoplasma* poderia funcionar como um “gatilho” para a ativação da *Clamidia* e, assim, promover a instabilização da placa aterosclerótica coronária.

1. CRITÉRIOS PARA ESCOLHA DA POPULAÇÃO

Como o objetivo foi avaliar se os títulos de Anticorpos anti-*Clamidia* e anti-*Micoplasma* se elevariam nas SIMI, selecionamos pacientes que estivessem apresentando um desses quadros agudos (SIMI com ou sem supra), e pacientes com aterosclerose crônica que estivessem estáveis ou assintomáticos, além de um grupo controle composto por indivíduos saudáveis.

A razão da escolha de pacientes com as diferentes formas de SIMI (angina instável, IAM com supra, IAM sem supra) foi avaliar se haveria diferenças da resposta sorológica nessas diferentes condições clínicas.

2. PLANEJAMENTO DO ESTUDO

Esse estudo piloto foi planejado de forma que, nos pacientes com SIMI, os Anticorpos anti-Clamidia e anti-Micoplasma fossem dosados em dois momentos: o primeiro durante o evento agudo e o segundo, seis meses após a alta hospitalar, com a finalidade de avaliar se haveria uma queda dos valores sorológicos durante este período.

O prazo de seis meses para a coleta da segunda amostra de sangue foi estabelecido para que o estímulo antigênico, decorrente da atividade infecciosa que levou à instabilização da placa, tivesse cessado e, conseqüentemente, os níveis de Anticorpos tivessem retornado aos seus valores basais⁵⁴.

Uma vez que os pacientes portadores de doença aterosclerótica crônica e os indivíduos do grupo controle estavam estáveis quando da inclusão no estudo, não era esperado que houvesse variação dos títulos sorológicos ao longo do tempo, por essa razão, as titulações foram realizadas, nesses grupos, uma única vez.

A Clamidia, o Micoplasma e outros agentes causadores de infecções respiratórias agudas são patógenos de alta prevalência, de forma que a partir da idade adulta, a maioria da população já apresenta Anticorpos nas avaliações soroepidemiológicas. Por essa razão, não foi feito o pareamento para idade no grupo controle, já que, na idade adulta, admite-se não existir relação entre os valores sorológicos e faixa etária^{17,22}. Assim, ao serem escolhidos indivíduos mais jovens para este grupo (doadores de sangue), diminuiria também a possibilidade de DAC clinicamente não detectável.

3. ESCOLHA DA TÉCNICA SOROLÓGICA

Dentro das técnicas sorológicas disponíveis, o método de Fixação de Complemento e o Elisa (“*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*”) são capazes de detectar anticorpos contra o gênero *Clamidia*, mas não distinguem entre as espécies *psittacci*, *trachomatis* e *pneumoniae*⁵⁵⁻⁵⁷.

Optamos pela técnica de Imunofluorescência indireta, que é considerada o teste “padrão” para o diagnóstico sorológico anti-*Clamidia*, devido à sua alta sensibilidade e especificidade. Entretanto, trata-se de um método de difícil interpretação e que envolve critérios subjetivos na leitura dos resultados. Por essas razões, os exames sorológicos do presente estudo foram realizados por um único e experiente examinador, o que anula a possibilidade de vieses em relação a este parâmetro⁵⁵⁻⁵⁷.

A imunoglobulina da classe IgG possui uma vida média de 20 a 30 dias, e a sua escolha deveu-se ao fato de ser este Anticorpos o que melhor expressa a atividade do processo infeccioso, em decorrência de re-infecções prévias⁵⁴.

O título de corte para o *Clamidia* foi de 1/80 e para o *Micoplasma* 1/10. As amostras de soro com títulos menores que esses foram consideradas negativas, visto que, nesses valores, cai a especificidade do método, havendo freqüentemente as “reações falso biológicas positivas” (cruzadas).

A classe IgA pode ser mais indicada para detectar infecções mais recentes ou cronicamente ativas com determinados agentes infecciosos, mas existem poucas evidências que seja aplicável à *Clamidia* e ao *Micoplasma*. Além disso, está demonstrado que o teste de imunofluorescência utilizado para a dosagem de IgA tem sensibilidade inconsistente⁵⁸.

É importante relatar que, mesmo não fazendo parte do nosso estudo, foi também dosado os Anticorpos da classe IgM (específico da primo-infecção) em todos os pacientes. Não foi encontrado nenhum resultado positivo e nenhuma viagem sorológica nos pacientes com duas amostras colhidas (negativo para positivo).

4. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS PACIENTES

Quanto as características clínicas dos pacientes, pode-se observar que os pacientes portadores de aterosclerose crônica tinham alguns fatores de risco extremamente elevados, tais como hipertensão arterial, que ocorreu em 83,3% dos casos, e dislipidemia, referida por 90% dos pacientes. A provável explicação para esses dados é que todos esses casos faziam parte de um ambulatório específico para acompanhamento de pacientes que estiveram na Unidade Coronária do Hospital de Base, devido à SIMI ou após procedimento de revascularização miocárdica sendo, portanto, casos de risco cardiovascular acima do habitual. Entretanto, a escolha desse ambulatório para a inclusão do grupo aterosclerose crônica deveu-se ao fato de o mesmo concentrar pacientes que apresentaram pelo menos um episódio de SIMI anteriormente, o que seria mais adequado para as comparações propostas.

Quando comparamos as características dos nossos pacientes com dados de estudos randomizados, observamos que alguns fatores de risco, tais como o tabagismo, foram mais frequentes no presente estudo, o que ocorreu tanto nos casos de SIMI com supra (68% versus 51%)⁵⁹, quanto nos casos sem supra (36,7% versus 22%)⁶⁰. Entretanto, quando esses mesmos dados são

comparados aos do registro multicêntrico GRACE “*The Global Registry of Acute Coronary Events*”)⁶¹, essas diferenças tornam-se muito menores: SIMI com supra (68% versus 62%) e SIMI sem supra (36,7% versus 43%). A alta prevalência de fatores de risco e comorbidades dos nossos pacientes podem ser pelo menos parcialmente, explicados, pelo fato de o Hospital de Base ser um serviço de referência, onde a maioria dos casos internados é de alta complexidade, particularmente aqueles internados na Unidade Coronária. Como as características dos hospitais que fazem parte do Registro GRACE⁶¹ são similares às nossas, os dados demográficos e epidemiológicos são semelhantes.

5. OBJETIVO PRINCIPAL

Nota-se, nas tabelas II e III, que os pacientes que apresentaram SIMI com supra tiveram redução significativa dos títulos dos Anticorpos anti-Clamídia e anti-Micoplasma entre as dosagens realizadas no momento do evento agudo e aquelas obtidas seis meses após esse quadro. Essa redução demonstra que a Clamídia e o Micoplasma presentes na placa aterosclerótica entraram em atividade, uma vez que seria extremamente improvável que tivesse ocorrido re-infecção simultânea pelos dois agentes, exatamente no período da coleta.

Poder-se-ia especular que a própria co-infecção da placa aterosclerótica pela Clamídia e pelo Micoplasma poderia ter sido o “gatilho” que faria com que esses dois agentes entrassem em atividade, desencadeando a cascata inflamatória que, por sua vez, levaria ao evento coronariano agudo.

É interessante observar que o mesmo não ocorreu nos pacientes sem supra, havendo apenas uma discreta redução dos níveis sorológicos anti-Clamídia, enquanto em relação ao Micoplasma não foi observada qualquer variação.

Esse fato sugere que, nesta forma de SIMI, tenha ocorrido uma reativação infecciosa de menor intensidade, possivelmente relacionada a um menor dano na placa aterosclerótica.

Quando comparamos os quatro grupos entre si, utilizando as amostras coletadas na primeira fase do estudo, observamos valores sorológicos numericamente mais elevados nos grupos que apresentaram evento coronário agudo (SIMI com e sem supra ST), em relação aos outros dois grupos (aterosclerose crônica e controle), tanto em relação aos Anticorpos anti-Clamídia quanto anti-Micoplasma. Entretanto, as diferenças encontradas não atingiram significância estatística.

Por outro lado, quando os grupos foram comparados dois a dois, demonstrou-se que, nos pacientes com SIMI, os títulos de Anticorpos anti-Clamídia foram significativamente mais elevados do que no grupo controle, o que ocorreu tanto nos pacientes com supra quanto nos pacientes sem supra. Os valores sorológicos anti-Micoplasma, foram significativamente mais elevados no grupo SIMI com supra do que no grupo aterosclerose crônica.

Quando tratada a presença de Clamídia e Micoplasma como variável categórica ao invés de contínua, nota-se que a maioria dos pacientes do estudo já estava cronicamente infectada tanto pela Clamídia quanto pelo

Micoplasma, porque apenas uma pequena porcentagem dos casos apresentava sorologia negativa.

Esse achado está de acordo com os dados da literatura que mostram que o ser humano durante toda a sua vida pode ser re-infectado por esses dois agentes infecciosos, seja endêmica ou epidemicamente.

Grayston e cols demonstraram que 75% das crianças de Seattle apresentavam sorologia positiva para Clamidia entre os 5 e 14 anos de idade. Além disso, 80% dos idosos permaneciam com soropositividade para Clamidia, à qual os autores atribuíram as freqüentes reinfecções²².

Não foram observadas diferenças significativas dos níveis sorológicos entre os grupos aterosclerose crônica e controle, tanto para Clamidia quanto para o Micoplasma. Esses dados sugerem que a participação do processo infeccioso poderia estar restrita apenas aos mecanismos de instabilização da placa. Por outro lado, não se pode descartar a possibilidade de que o grupo controle tenha valores sorológicos semelhantes ao grupo dos pacientes portadores de DAC crônica, porque eles já estariam com o processo de aterosclerose em andamento.

É importante lembrar que, até o momento, não está totalmente esclarecido em que fase da doença aterosclerótica a infecção exerce o seu papel: se no início do processo, se na progressão do mesmo, se na instabilização da placa de ateroma, ou se em todas as fases.

O fato de os grupos SIMI, com e sem supra, apresentarem valores sorológicos significativamente maiores do que o grupo controle reforça os dados já demonstrados durante a fase do evento agudo em que os títulos de

Anticorpos foram mais elevados do que seis meses após. Entretanto, o mesmo não ocorreu em relação ao Micoplasma, que apenas apresentou diferenças nos títulos sorológicos entre os grupos SIMI com supra e aterosclerose crônica.

Pode-se conjecturar que a presença do Micoplasma seria necessária para a ativação da Clamidia, mas que apenas esta última apresentaria variações mais intensas nos seus níveis sorológicos. Entretanto, não está claro porque, para a Clamidia, não houve diferenças quanto aos ateroscleróticos crônicos.

A comparação entre os resultados do presente estudo e os demais estudos soropidemiológicos não é simples, fundamentalmente por conta das importantes diferenças metodológicas entre eles. Na grande maioria, esses estudos foram retrospectivos^{9,12,62,63,64}, e, em dois deles, os pacientes provinham de um estudo de coorte (*“nested case control”*)^{25,65}. Os poucos estudos prospectivos disponíveis utilizaram variadas técnicas de dosagem de Anticorpos, diferentes critérios para positividade sorológica, e diferentes tipos de ajustes para os fatores de risco cardíaco^{11,13,24}.

Os resultados obtidos por esses estudos são controversos: todos os retrospectivos demonstraram associação entre títulos elevados de Anticorpos anti-Clamidia e risco aumentado de DAC ou infarto do miocárdio^{9,12,62,63,64}. Em dois deles, quando se fez a análise ajustada, essa associação só se manteve no subgrupo de fumantes, enquanto nos demais estudos que fizeram esta análise não foi encontrado o mesmo resultado^{12,65}.

Ainda em relação aos estudos retrospectivos, um deles, realizado por Mendall e cols⁶², obteve um dado interessante. Após ajuste para sexo, idade, fumo, classe social e ambiente familiar, o único fator de risco identificável para

os altos títulos de Anticorpos anti-Clamidia foi o número de crianças que viviam na casa. Tal fato implica que, nesses indivíduos, a presença de altos títulos sorológicos poderia ter como causa as re-infecções, devido ao contato freqüente com essas crianças que são as principais carreadoras desse agente.

Quanto aos estudos prospectivos, enquanto dois deles mostraram associação entre soropositividade para Clamidia e risco de eventos coronarianos a médio e longo prazo^{11,13}, um estudo de larga escala prospectivo não conseguiu reproduzir esses resultados²⁴. Entretanto, uma metanálise incluindo mais de 20 estudos demonstrou que essa associação efetivamente existe³³.

Após a publicação dos estudos ACES³⁹ e PROVE-IT⁴⁰ em que resultados negativos foram obtidos quando da utilização de antibióticos no sentido de prevenção de eventos isquêmicos, criou-se uma grande polêmica na comunidade científica em relação à participação da infecção na doença aterosclerótica, o que fica claro quando avaliamos as diferentes posições publicadas recentemente⁶⁶⁻⁶⁸.

Um dos principais aspectos discutidos é que a grande maioria desses estudos usou antibióticos bacteriostáticos da classe dos macrolídeos (azitromicina, roxitromicina ou claritromicina), e apenas o estudo PROVE-IT usou a gatifloxacina, um antibiótico bactericida da família das quinolonas^{66,67}.

Os antibióticos macrolídeos não inibem o crescimento da bactéria dentro das placas ateroscleróticas e das células monocitárias circulantes, principal carreador desses agentes infecciosos no abastecimento dos “santuários” do organismo^{69,70}.

Mesmo em relação às quinolonas, existem dúvidas sobre a sua efetividade, porque a erradicação da *Clamidia* “in vivo” é extremamente difícil, se não impossível, mesmo com tratamento por longo prazo. Além disso, a penetração dos antibióticos nas lesões ateromatosas é questionada^{69,70}.

É importante destacar que, nesses estudos, não houve padronização da dose diária, da duração do tratamento e do prazo de seguimento dos pacientes³⁵⁻⁴⁰.

Existem sugestões que uma alta carga de patógenos, definidos como a presença de imunoglobulinas séricas para vários agentes infecciosos, correlaciona-se a uma maior agressividade desses microorganismos. Nesses casos, talvez fosse necessário um esquema antimicrobiano diferente daquele usualmente utilizado nos casos com menor carga infecciosa⁷¹.

Ainda em relação aos estudos que utilizaram antibióticos anti-clamidiaais, outros aspectos poderiam explicar a ausência dos benefícios esperados: a) a aterosclerose humana desenvolve-se precocemente, desde as primeiras décadas de vida, sendo assim possível que a antibioticoterapia não tenha sucesso quando utilizada em pacientes que já tenham DAC estabelecida; b) o fato de ser muito rara a detecção de microorganismos viáveis em uma placa de ateroma pode ocorrer porque, a partir de um determinado momento, a sua concentração ficaria extremamente reduzida e, conseqüentemente, não poderia haver benefícios com o uso do antibiótico; c) como a re-infecção pela *Clamidia* é extremamente freqüente, um simples curso de terapia com antibiótico poderia não ser suficiente para todo o tempo de seguimento do paciente^{66-68,72}.

Quando todas as evidências existentes, até o momento, sobre a relação entre Clamídia e doença arterial coronária aguda e crônica são tomadas em conjunto, os pesquisadores concordam em alguns pontos: a) a associação entre Clamídia e aterosclerose está demonstrada por meio de estudos soroepidemiológicos e histopatológicos; b) o uso de terapia antibiótica anti-clamidal em pacientes portadores das mais diferentes formas de doença arterial coronária não reduz eventos cardiovasculares; c) antes que sejam realizados novos estudos de terapêutica, muitos aspectos epidemiológicos e etiopatogênicos precisam ser esclarecidos^{66,67,72}.

Uma das dúvidas que persiste até o momento é se a presença de vários microorganismos, atuando simultaneamente em um mesmo indivíduo, poderia exacerbar o processo aterosclerótico^{73,74}. Neste sentido, os resultados do presente estudo sugerem que sim.

Recentemente, foi publicado um estudo em que, numa população com suspeita de DAC submetida à angiografia coronária, foram realizadas análises sorológicas utilizando o teste ELISA para dosar os Anticorpos anti-Clamídia, e o teste de Reação de Fixação de Complemento para dosar os Anticorpos anti-Micoplasma, sendo colhida apenas uma amostra de cada paciente. Desses pacientes, 396 (72%) tinham DAC com grau de estenose acima de 50%.

Após análise multivariada, a soropositividade para Micoplasma foi associada com DAC somente nos pacientes que apresentavam soropositividade para Clamídia (*Odds ratio*= 5,1; IC 95% 1,8 a 14,9). Os autores concluíram que a co-infecção por Clamídia e Micoplasma pode ser um importante fator de risco para DAC⁷⁵.

Apesar de não ter sido utilizada a técnica sorológica mais adequada, e de não haver um grupo controle de indivíduos saudáveis, os resultados dessa publicação reforçam os dados encontrados no presente estudo.

Após extensa revisão da literatura, e até onde seja do nosso conhecimento, o nosso estudo foi o primeiro que avaliou a participação da Clamídia e o Micoplasma nas SIMI, por meio de acompanhamento sorológico e comparação com grupo controle e portadores de aterosclerose crônica.

6. ANÁLISES SECUNDÁRIAS

Em relação aos objetivos secundários, foi realizada análise de regressão logística e demonstrado que tanto os níveis sorológicos da Clamídia quanto os do Micoplasma não foram preditores independentes de óbito. Vale destacar que o tamanho da amostra não permitiu qualquer conclusão definitiva sobre este tópico.

Em relação aos subgrupos analisados, não houve diferenças significativas entre esses parâmetros e os valores sorológicos realizados no início do estudo, tanto para a sorologia anti-Clamídia quanto para anti-Micoplasma.

7. LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Uma das limitações do presente estudo foi a falta de dados soroepidemiológicos brasileiros para efeito de comparação com os nossos

pacientes. Além disso, o acompanhamento sorológico no grupo de pacientes ateroscleróticos crônicos poderia nos fornecer informações adicionais.

Outra limitação do presente estudo se refere ao grupo controle, pois, quaisquer que sejam os critérios usados na seleção desses indivíduos, não se pode assegurar que não exista doença aterosclerótica em instalação ou que a pessoa não tenha sofrido uma reinfecção recente por um dos agentes infecciosos avaliados⁷².

Finalmente, quanto às análises secundárias, o estudo não tinha poder estatístico suficiente para permitir conclusões definitivas, tendo sido as mesmas implementadas apenas no sentido de levantar eventuais novas hipóteses sobre o assunto em discussão.

CONCLUSÕES

V - CONCLUSÕES

1. OBJETIVO PRINCIPAL

O presente estudo demonstra associação entre títulos de anticorpos anti-Clamidia e anti-Mycoplasma e instabilização coronária. Demonstra ainda a normalização daqueles títulos em um período de até seis meses, a partir do quadro agudo.

2. ANÁLISES SECUNDÁRIAS

- a) No presente estudo, os níveis sorológicos anti-Clamidia e anti-Mycoplasma não foram preditores de eventos em pacientes com síndromes isquêmicas miocárdicas instáveis.
- b) As análises de acordo com sexo e idade, pré-especificadas por protocolo, não demonstraram interações entre essas variáveis e os parâmetros obtidos no objetivo principal do presente estudo.

ABSTRACT

VI- ABSTRACT

Introduction: a recent Brazilian study found the concomitant presence of *Mycoplasma Pneumoniae* and *Clamidia Pneumoniae* in stable and unstable atheromatous coronary lesions. The objective of the present study was to test the association of serum titers of anti-*Clamidia* and anti-*Mycoplasma* antibodies and Acute Coronary Syndrome.

Methods: 138 patients were prospectively studied and divided into 4 groups: 34 patients with Acute Coronary Syndrome with ST-segment elevation, 40 patients with Acute Coronary Syndrome without ST-segment elevation, 30 patients with chronic asymptomatic atherosclerosis and 34 blood donors without known coronary disease. In the first two groups, serum samples were collected during the acute event and after six months of follow-up, whereas in the other two (chronic atherosclerosis and control) serum samples were collected only once. In all samples, anti-*Clamidia* and anti-*Mycoplasma* IgG antibodies, were measured by indirect immunofluorescence.

Results: six months after hospitalization, patients with acute coronary syndrome with St-segment elevation showed a significant decrease of serum titers, when compared to samples collected during the acute coronary event, which was observed both with *Clamidia* (307.5 ± 47.5 versus 650 ± 115.7 $p=0.0001$) and *Mycoplasma* (21.5 ± 3.5 versus 36.5 ± 5 $p=0.0004$). The group without ST-segment elevation did not have a significant change of serum levels within six months of follow-up (522.6 ± 102.7 versus 576 ± 84.1 $p=0.27$) for *Clamidia* and 27.6 ± 5.8 versus 27.6 ± 5.8 $p > 0.99$ for *Mycoplasma*. Serum levels

of all groups were also compared, and it was observed that the groups with acute coronary syndrome (with and without ST-segment elevation) had higher serum levels than the atherosclerosis group and the control group, but the differences were not significant. Chlamidial levels were: 650 ± 115.7 (with elevation), 576 ± 84 (without elevation), 373.3 ± 65 (chronic atherosclerosis) and 343.5 ± 57.2 (control), $p=0.083$; *Mycoplasma* values were: 36.5 ± 5 (with elevation), 27.6 ± 5.8 (without elevation), 23 ± 4.3 (chronic atherosclerosis) and 26.7 ± 3.3 (control), $p=0.171$.

Conclusions: the present study showed the association between anti-*Chlamidia* and anti-*Mycoplasma* antibody titers and acute coronary syndrome. It also showed normalization of the titers within a period of six months of the acute picture.

ANEXOS

ANEXO A

VII – ANEXOS

ANEXO A:

Planilha

Doença Arterial Coronária e Infecção por **Mycoplasma/Chlamydia**

A) Identificação:

Nome: _____

RG (HB): _____ Sexo: ☐ 1. Masc ☐ 2. Fem Idade: _____ anos

Endereço: _____

Cidade: _____ Fone: () _____

CEP: _____ Data Admissão: ____ / ____ / ____ . Hora Admissão: ____ : ____ .

B) Diagnóstico Inicial:

	1. Sim	2. Não
B1) Síndrome Isquêmica Miocárdica Instável (SIMI) com supra	☐	☐
B2) Síndrome Isquêmica Miocárdica Instável (SIMI) sem supra	☐	☐
B3) Aterosclerose crônica assintomática	☐	☐
B4) Normal	☐	☐

C) Escore de Risco TIMI

Pontos:

1. Idade ≥ 65 anos ☐
 2. Fatores de risco para DAC (≥ 3 fatores somam 1 ponto) ☐
-
☐ Hipertensão	☐ Tabagismo	
☐ Diabetes	☐ História Familiar	☐
☐ Dislipidemia		
-
3. Doença coronária conhecida (estenose $\geq 50\%$) ☐
 4. Uso prévio de AAS (dentro dos últimos 7 dias) ☐
 5. 2 ou mais episódios de angina em repouso em 24 horas ☐
 6. Elevação de enzimas cardíacas ☐
 7. Desvio do segmento ST $\geq 0,5$ mm ☐

Total de pontos: _____

D) Classe Forrester na admissão:

☐ I ☐ II a ☐ II b ☐ III

E) Eletrocardiograma:

☐ 1. Normal ☐ 2. Inversão T ☐ 3. Infra ST ☐ 4. Supra ST ☐ 5. BRE

F) Enzimas Cardíacas:

CK-MB Nível do pico: _____ UI/l
Horário (tempo): _____ : _____

Troponina T Nível do pico: _____ UI/l
Horário (tempo): _____ : _____

G) Antecedentes pessoais e familiares:

	1. Sim	2. Não
Angina do peito prévia	☐	☐
Infarto do miocárdio prévio	☐	☐
Angioplastia coronária prévia	☐	☐
Revascularização do miocárdio prévia	☐	☐
Hipertensão arterial	☐	☐
Diabetes Mellitus	☐	☐
Dislipidemia	☐	☐
Tabagismo	☐	☐
História familiar	☐	☐
Quadro infeccioso nos últimos 60 dias	☐	☐
Uso de antibióticos nos últimos 60 dias	☐	☐

H) Uso prévio de medicamentos:

	1. Sim	2. Não
Betabloqueadores	☐	☐
Antagonistas do cálcio	☐	☐
Nitratos	☐	☐
Aspirina	☐	☐
Inibidores da ECA	☐	☐
Vastatinas	☐	☐

Outros: _____

I) Medicamentos utilizados durante a internação:

	1. Sim	2. Não
t-PA	()	()
Estreptoquinase	()	()
Nitroglicerina	()	()
Heparina	()	()
Aspirina	()	()
Betabloqueadores	()	()
Antagonistas do cálcio	()	()
Nitrato VO	()	()
Inibidores da ECA	()	()
Vastatinas	()	()

Outros: _____

J) Evolução:

	1. Sim	2. Não	Data
Infarto	()	()	____ / ____ / ____ .
Reinfarto	()	()	____ / ____ / ____ .
Óbito	()	()	____ / ____ / ____ .
Forrester na alta	() I	() IIa	() II b () III

K) Tipo de procedimento realizado:

	1. Sim	2. Não
Tratamento clínico	()	()
Intervenção coronária percutânea	()	()
Revascularização do miocárdio	()	()

L) Medicamentos na alta:

	1. Sim	2. Não
Betabloqueadores	()	()
Antagonistas do cálcio	()	()
Nitratos	()	()
Aspirina	()	()
Inibidores da ECA	()	()
Vastatinas	()	()

Outros:

M) Data da alta: ____ / ____ / ____ .

N) Tempo de hospitalização: ____ dias.

O) Retorno (6 meses):

Data: ____ / ____ / ____ .

Forrester: () I

() II a

() II b

() III

P) Eventos:

	Data:	Observações:
Internação	____ / ____ / ____ .	_____
Infarto	____ / ____ / ____ .	_____
Reinfarto	____ / ____ / ____ .	_____
Nova angioplastia coronária	____ / ____ / ____ .	_____
Nova revascularização	____ / ____ / ____ .	_____
Óbito	____ / ____ / ____ .	_____

ANEXO B

VII - ANEXOS

ANEXO B:

HOSPITAL de BASE

da

FACULDADE DE MEDICINA DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO (FAMERP)

TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE:.....
 DATA NASCIMENTO:/...../.....
 ENDEREÇO N° APTO:.....
 BAIRRO:.....CIDADE :
 CEP:.....TELEFONE: DDD (.....)
2. RESPONSÁVEL LEGAL
 NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
 DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M F
 DATA NASCIMENTO:/...../.....
 ENDEREÇO: N° APTO:.....
 BAIRRO:CIDADE:
 CEP: TELEFONE: DDD (.....).....

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Análise da prevalência da *Chlamydia pneumoniae*. e *Mycoplasma* em diferentes formas de apresentação da doença coronária obstrutiva

PESQUISADOR: Dr Irineu Luiz Maia

CARGO/FUNÇÃO: Docente Chefe da Disciplina de Infectologia INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL N° 21441

UNIDADE DO HCFMUSP: Hospital de Base – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

AValiação DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO () RISCO MÍNIMO () RISCO MÉDIO ()

RISCO BAIXO (X) RISCO MAIOR ()

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 12 meses
-

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNANDO:

Para a melhor compreensão acerca deste estudo, alguns conceitos são importantes: a doença coronária é causada por uma placa de ateroma (placa de gordura) nas artérias coronárias. Esta placa pode aumentar de tamanho e, se chegar a obstruir (entupir) mais de 70% da artéria, a pessoa começa a apresentar sintomas de angina (dor, geralmente no peito, relacionada à falta de sangue no músculo do coração). A qualquer momento, esta placa pode sofrer uma complicação, principalmente rotura, ou seja, a placa pode se quebrar. Se isto acontecer, ocorrerá a formação de uma espécie de coágulo sangüíneo que vai piorar a obstrução, levando à angina instável ("ameaça de infarto"), ou mesmo ocluir a artéria, o que levaria ao infarto. Este estudo vai avaliar se uma bactéria chamada *Mycoplasma* pode ativar ("acordar") uma outra bactéria chamada *Clamidia* e as duas juntas levarem à infecção desta placa de ateroma. Essa infecção enfraqueceria a placa, fazendo que ela tenha mais chance de sofrer aquelas complicações explicadas anteriormente.

Se você concordar em participar, serão colhidos aproximadamente 10 mililitros de sangue através de uma veia do seu braço, a fim de se pesquisar a presença de anticorpos contra as duas bactérias explicadas anteriormente: *Mycoplasma* e *Clamidia*. Se os anticorpos estiverem presentes, significa que você entrou em contato com a bactéria.

Riscos - Fui informado pelo investigador, **Dr. Irineu Luiz Maia** que, durante o período de investigação, posso correr os seguintes riscos: como serão realizadas duas punções venosas para coleta de sangue, poderão ocorrer hematomas (sangue coagulado) e dor local.

Outros Tratamentos– Fui informado que, se eu decidir não participar do estudo ou o Investigador não me considerar em condições, por não preencher os requisitos determinados pelo protocolo, receberei outro tratamento e/ou orientação a critério médico.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:

- 1- Informações sobre a pesquisa:** fui informado de que terei acesso, a qualquer tempo, às informações acerca de procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, incluindo eventuais dúvidas.
- 2. Liberdade de retirar consentimento:** fui informado de que terei a liberdade para retirar meu consentimento a qualquer momento e para deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.
- 3. Salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade:** fui informado de que todas as informações obtidas da minha participação neste estudo será tratada de forma confidencial, ficando minha identidade, sob todas as hipóteses, mantida em sigilo. As informações desta investigação poderão ser utilizadas para publicação nos veículos da imprensa científica ou apresentação em reuniões ou congressos médicos, preservada minha identidade.
- 4. Disponibilidade de assistência:** fui informado de que terei disponibilidade de assistência no Hospital de Base, por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.

V. NO CASO DE OCORRER INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS COMUNICAR IMEDIATAMENTE:

Dr. Irineu Luiz Maia, Rua Raul de Carvalho, 3862, Alto Rio Preto, São José do Rio Preto, SP.

Telefones: residência: (017) 32319445; Hospital de Base: (017) 32015000 ramal 5006.

VI - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e compreendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo, _____ de _____ de 20____.

Assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

Assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome legível)

OBS: o preenchimento do Termo de Consentimento Pós-Esclarecido foi feito de acordo com a Resolução do Conselho Nacional de Saúde 196, de 10 de outubro 1996.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VIII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ROSS, R. The pathogenesis of atherosclerosis: an update. **N Engl J Med**; v.314(8), p.488-50, 1986.
2. OSLER, W. Diseases of the arteries. in: OSLER W (Ed). **Modern Medicine: Its Practice and Theory Philadelphia**. London: Lea e Febiger, 1908 717 p.
3. ROSS, R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. **N Engl J Med**; v. 340, p. 115–126, 1999.
4. FABRICANT, C.G.; FABRICANT, J.; LITRENTA, M.M.; MINICK, C.R. Virus-induced atherosclerosis. **J Exp Med**; v.148, p.335-40, 1978.
5. PETERSON W.L. Helicobacter pylori and peptic ulcer disease. **N Engl J Med**; v.324(15), p.1043-48, 1991.
6. LIBBY P.; EGAN D.; SKARLATOS S. Roles of infectious agents in atherosclerosis and restenosis: an assessment of the evidence and need for future research. **Circulation**; v. 96; p. 4095–4103; 1997.
7. SAIKKU, P.; LEINONEN, M.; MATTILA, K.; EKMAN, M.R.; NIEMINEN M.S.; MAKELA, P.H.; HUTTUNEM, J.K.; VALTONEN, V. Serological evidence of an association of a novel Chlamydia, TWAR, with chronic coronary heart disease and acute myocardial infarction. **Lancet**; v.2, p.983-86, 1988
8. HEISS, G.; SHARRETT, A.R.; BARNES, R.; CHAMBLESS, L.E.; SZKLO, M.; ALZOLA, C. Carotid atherosclerosis measured by B-mode ultrasound in populations: associations with cardiovascular risk factors in the ARIC study. **Am. J. Epidemiol.**; v.134, p.250–256, 1991.

9. SAIKKU, P.; LEINONEN, M.; TENKANEN, L.; LINNANMÄKI, E.; B'EKMANET, M.R.; MANNINEN, V.; MÄNTTARI, M.; FRICK, M.H.; HUTTUNEN, J.K. Chronic Chlamydia pneumoniae infection as a risk factor for coronary heart disease in the Helsinki Heart Study. **Ann Intern Med**; v.116, p.273-78, 1992.

10. THOM, D.H.; GRAYSTON, J.T.; SISCOVICK, D.S.; WANG, S.P.; WEISS, Association of prior infection with Chlamydia pneumoniae and angiographically demonstrated coronary artery disease. **JAMA**; v.268(1), p.68-72, 1992.

11. FAGERBERG, B.; GNARPE, J.; GNARPE, H. *Chlamydia pneumoniae* but not Cytomegalovirus antibodies are associated with future risk of stroke and cardiovascular disease. **Stroke**; v.30, p.299–305, 1999.

12. WIMMER, M.L.; SANDMANN-STRUPP, R.; SAIKKU, P.; HABERT, R.L. Association of Chlamydial infection with cerebrovascular disease. **Stroke**; v.27(12), p.2207-10, 1996

13. TRABULSI L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.F.; CANDEIAS, J.A.N. **Microbiologia**, Ed Atheneu: São Paulo, 1999, 718 p.

14. GRAYSTON, J.T.; KUO, C.C.; WANG, S.P; ALTMAN, J. A new *Chlamydia psittaci* strain, TWAR, isolated in acute respiratory tract infections. **N Engl J Med**; v.315, p. 161-168, 1986

15. ZHONG, G.; FAN, T.; LIU, L. Chlamydia inhibits interferon gamma-inducible major histocompatibility complex class II expression by degradation of upstream stimulatory factor 1. **J Exp Med**; v.189; p.1931-1938; 1999

16. ZHONG, G.; LIU, L.; FAN, T.; JI, H. Degradation of transcription factor RFX5 during the inhibition of both constitutive and interferon gamma-inducible major histocompatibility complex class I expression in chlamydia-infected cells. **J Exp Med**; v.191; p.1525-1534; 2000

17. SISCOVICK, D.S.; SCHWARTZ, S.M.; CAPS, M.; WANG, S.P.; GRAYSTON, J.T.. Chlamydia pneumoniae and atherosclerotics risk in populations: the role of seroepidemiology. **J Infect Dis**; v. 181 (Suppl 3); p. S417-20; 2000.

18. LEINONEN, M.; LINNANMÄKI, E.; MATTILA, K.; NIEMINEN, M.S.; VALTONEN, V.; LEIRISALO-REPO, M.; SAIKKU, P. Circulation immune complexes containing Chlamydial lipopolysaccharide in acute myocardial infarction. **Microb Pathog**; v.9, p.67-73, 1990

19. MUHLESTEIN, J.B.; ANDERSON, J.L.; HAMMOND, E.H.; ZHAO L.; TREHAN, S.; SCHWOBE, E.P.; CARLQUIST, J.F. Infection with Chlamydia pneumoniae accelerates the development of atherosclerosis and treatment with azithromycin prevents it in a rabbit model. **Circulation**; v.97, p.633-36, 1998.

20. KOL, A.; SUKHOVA, G.K.; LICHTMAN, A.H.; LIBBY, P. Chlamydial heat shock protein 60 localizes in human atheroma and regulates macrophage tumor necrosis factor alpha and matrix metalloproteinase expression. **Circulation**; v.98(4), p.300-7, 1998.

21. HIRONO, S.; DIBROV, E.; HURTADO, C.; KOSTENUK, A.; DUCAS, R.; PIERCE, G. Chlamydia pneumoniae stimulates proliferation of vascular smooth muscle cells through induction of endogenous heat shock protein 60. **Cir Res**; v.93, p.710-16, 2003.

22. GRAYSTON, J.T. Background and current knowledge of *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis. **J Infect Dis**; v. 181; p.S402–10; 2000.
23. FAGERBERG, B.; GNARPE, J.; GNARPE, H. *Chlamydia pneumoniae* but not Cytomegalovirus antibodies are associated with future risk of stroke and cardiovascular disease. **Stroke**; v.30, p.299–305, 1999
24. RIDKER, P.M.; KUNDSIN, R.B.; STAMPFER, M.J. Prospective study of *Chlamydia pneumoniae* IgG seropositivity and risks of future myocardial infarction. **Circulation**; v.99, p.1161–64, 1999.
25. ARCARI, C.M.; GAYDOS, C.A.; NIETO, F.J.; KRAUSS, M.; NELSON, K.E.. Association between *C pneumoniae* and Acute Myocardial Infarction in young men in the United States military: The importance of timing of exposure measurement. **CID**; v.40; p.1123-30; 2005.
26. KUO, C.C.; SHOR, A.; CAMPBELL, L.A.; FUKUSHI, H.; PATTON, D.L.; GRAYSTON, J.T. Demonstration of *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerotic lesions of coronary arteries. **J. Infect. Dis.**; v.167, p.841–49. 1993.
27. RAMIREZ, J.A. Isolation of *Chlamydia pneumoniae* from the coronary artery of a patient with coronary atherosclerosis. The *Chlamydia pneumoniae*/Atherosclerosis Study Group. **Ann. Int. Med.**; v.125, p.979–82, 1996.
28. GRAYSTON, J.T.; KUO, C.C.; COULSON, A.S.; CAMPBELL, L.A.; LAWRENCE, R.D.; LEE, M.J.; STRANDNESS, E.D.; WANG, S.P. *Chlamydia pneumoniae* (TWAR) in atherosclerosis of the carotid artery. **Circulation**; v.92, p.3397–3400, 1995.

29. KUO, C.C.; GOWN, A.M.; BENDITT, E.P.; GRAYSTON, J.T. Detection of *Chlamydia pneumoniae* in aortic lesions of atherosclerosis by immunocytochemical stain. **Arterioscler. Thromb.**; v.13, p.1501–4, 1993.

30. KUO, C.C. ; GRAYSTON, J.T. ; COULSON, A.S.; CAMPBELL, L.A. ; WANG, S.P. *Chlamydia pneumoniae* (TWAR) in coronary arteries of young adults (15–34 years old). **Proc. Nat. Acad. Sci. USA.**; v.92, p.6911-14, 1995.

31. MUHLESTEIN, J.B.; HAMMOND, E.H.; CARLQUIST, J.F.; RADICKE, E.; THOMSON, M.J.; KARAGOUNIS, L.A.; WOODS, M.L.; ANDERSON, J.L. Increased incidence of *Chlamydia* species within the coronary arteries of patients with symptomatic atherosclerotic versus other forms of cardiovascular disease. **J. Am. Coll. Cardiol.**; v.27, p.1555–61, 1996.

32. TAYLOR-ROBINSON, D.; THOMAS, B.J. *Chlamydia pneumoniae* in arteries: the facts, their interpretation, and future studies. **J. Clin. Pathol.**; v.51, p.793-7, 1998.

33. DANESH, J.; WHINCUP, P.; WALKER, M. Low grade inflammation and coronary heart disease: prospective study and updated meta-analyses. **BMJ.**; v.321, p.199-204, 2000.

34. GUPTA, S.; LEATHAM, E.W.; CARRINGTON, D.; MENDALL, M.A.; KASKI, pilot study. *Chlamydia pneumoniae* antibodies, cardiovascular events, and azithromycin in male survivors of myocardial infarction. **Lancet**; v.350, p.404-7, 1997.

35. GURFINKEL, E.; BOSOVICH, G.; DAROCA, A.; BECK, E.; MAUTNER, B. Randomised trial of roxithromycin in non-Q-wave coronary syndromes: Roxis pilot study. **Lancet**; v. 350; p. 404-7; 1997.

36. ANDERSON, J.L.; MUHLESTEIN, J.B. ; CARLQUIST, J.F. ; Randomized secondary prevention trial of azithromycin in patients with coronary artery disease and serological evidence for *Chlamydia pneumoniae* infection. **Circulation**; v.99, p.1540–47, 1999.

37. O'CONNOR, C.M.; DUNNE, M.W.; PFEFFER, M.A.; MUHLESTEIN, J.B.; YAO, L.; GUPTA, S.; BENNER, R.J.; FISHER, M.R.; COOK, T.D. Azithromycin for the secondary prevention of coronary heart disease events. The Wizard Study: A randomized controlled trial. **JAMA**; v.209(11), 1459-66, 2003.

38. CERCEK, B.; SHAH, P.K.; NOC, M.; ZAHGER, D.; ZEYMER, U.; MATETZKY, S.; MAURER, G.; MAHRER, P. Effect of short-term treatment with azithromycin on recurrent ischaemic events in patients with acute coronary syndrome in the Azithromycin in Acute Coronary Syndrome (AZACS) trial: a randomized controlled trial. **Lancet**; v.361(9360), p.809-13, 2003.

39. GRAYSTON, J.T. ; KRONMAL, R.A. ; JACKSON, L.A.; PARISI, A.F.; MUHLESTEIN, J.B.; COHEN, J.D. ACES Investigators. Azithromycin for the secondary prevention of coronary events. **N Eng J Med**; v. 352; p.1637-45; 2005.

40. CANNON, C. P.; BRAUNWALD, E.; MCCABE, C. H.; ROULEAU, J. L.; BELDER, R.; PFEFFER, M. A.; SKENE, A. M. Intensive versus Moderate Lipid Lowering with Statins after Acute Coronary Syndromes For the Pravastatin or Atorvastatin Evaluation and Infection Therapy-Thrombolysis in Myocardial Infarction 22 Investigators* (PROVE-IT-TIMI 22). **N. Engl. J. Med.**; v.350(15), p.1495-1504, 2004.

41. 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 rupture plaque vessel segments at autopsy. A comparative study with stable plaques. **Arq Bras Cardiol**; v.74(2), p.149-51, 2000.

42. 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(9), p.1023-6, 2000.

43. HIGUCHI, M.L.; HIGUCHI-DOS-SANTOS, M.H.; PIERRI, H.; PALOMINO, S.; SAMBIASE, N.; RAMIRES, J.A.F.; WAJNGARTEN, M. *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia* in calcified nodules of aortic stenotic valves. **Rev Inst Med Trop São Paulo**; v.44(4), p.209-12, 2002.

44. RAZIN, S.; YOGEV, D.; NAOT, Y.. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, p. 1094-1156, 1998.

45. ALMAGOR, M.; KAHANE, I.; YATSI, S.. Role of the superoxide anion in host cell injury induced by *M. pneumoniae* infection. A study in normal and trisomy 21 cells. **Journal of Clinical Investigation**; v. 73; p. 842-7; 1984.

46. ESPINOLA-KLEIN, C.; RUPPRECHT, H.J.; BLANKENBERG, S.; BICKEL, C.; KOPP, H.; RIPPIN, G.; VICTOR, A.; HAFNER, G.; SCHLUMBERGER, W.; MEYER, J. Impact of infectious burden on extent and long-term prognosis of atherosclerosis. **Circulation**; v.105, p.15-21, 2002.

47. ZHU, J.; QUYYUMI, A.A.; NORMAN, J.E.; CSACO, G.; WACLAWIW, M.A.; SHEARU, G.M.; EPSTEIN, S.E. Effects of total pathogen burden on coronary artery disease risk and C-reactive protein levels. **Am J Cardiol.**; v.85, p.140-46, 2000.

48. NICOLAU, J.C; MARIN, J.A. **Síndromes isquêmicas miocárdicas instáveis**. Ed Atheneu: São Paulo, 2001. 448 p.

49. GRANATO, C. Procedimentos operacionais padrão. **Manual do laboratório Fleury**, São Paulo, 2005

50. SHEARMAN, M.J.; CUBIE, H.A.; INGLIS, J.M. Mycoplasma pneumoniae infection: early diagnosis by detection of specific IgM by immunofluorescence. **Br J Biome Sci**; V.50, P.305-08, 1993.

51. RUNYON, R.P. **Fundamentals of statistics in the biological, medical, and health sciences**. Boston: PWS Publishers, 1985. p.314.

52. CORDEIRO, J.A. Análise de dependência. São José do Rio Preto, [Tese de Livre Docência]. Unesp-Universidade Ibilce, 1990.

53. CLEOPHAS, TJ; ZWINDERMAN, AH; CLEOPHAS, TF. **Statistics applied to clinical trials**. Dordrecht. Kluwer Academic Publishers, 2000. 295 p.

54. PARHAM, P. **O Sistema Imune**. Ed Art. Méd: Porto Alegre; 2001. 372 p.

55. ORFILLA, J.J. Seroepidemiological evidence for an association between Chlamydia pneumoniae and atherosclerosis. **Atherosclerosis**. V.140 (Suppl) 1; p.S11-5; 1998.

56. BROOKS G.F., BUTEL J.S., MORSE S.A. **Microbiologia médica**—Ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro; 2000. 614 p.
57. A. OLIVEIRA LIMA; J. BENJAMIN SOARES; J.B. GRECO; J. GALIZZI; J. ROMEU CANÇADO in: **Métodos de laboratório aplicados à clínica** (técnica e interpretação) Ed Guanabara Koogan; Rio de Janeiro, 2001, 366p.
58. WANG, S. P.; GRAYSTON, J.T.. IgA antibody response in Chlamydia pneumoniae (TWAR) infection. In: Saikku P. ed Proceedings of the 9th **European Chlamydia Congress Helsinki** 2000.
59. SABATINE, M.S.; CANNON, C.P.; GIBSON, C.M. ; LOPEZ-SENDON, JL; BRAUNWALD, E. FOR THE CLARITY-TIMI 28 STUDY INVESTIGATORS. Addition of clopidogrel to aspirin and fibrinolytic therapy for myocardial infarction with ST-segment elevation. **N Engl J Med.** ;v. 352 (12) ;p.1179-89; 2005.
60. YUSUF, S.; MEHTA, S. for THE OASIS 5 INVESTIGATORS. Oral Presentation; Stockholm **European Society of Cardiology Congress**, 2005.
61. THE GRACE INVESTIGATORS. Baseline characteristics, management practices, and in-hospital outcomes of patients hospitalized with acute coronary syndromes in the Global Registry of Acute Coronary Events (GRACE). **Am J Cardiol.** ; v. 90(4); p. 358-63; 2002.
62. MENDALL, M.A.; CARRINGTON, D.; STRACHAN, D.; PATEL, P.; MOLINEUAX, N.; LEVI, J.; TOOSEY, T.; CAMM, A.J.; NORTHFIELD, T.C. Chlamydia pneumoniae: risk factors for seropositivity and association with coronary heart disease. **J. Infect.**; v.30(2), p.121-8, 1995.

63. BLASI, F.; CONSENTINI, R.; RACANELLI, R.; MASSARI, F.M.; AROSIO, C.; TARSIA, P.; ALLEGRA, L. A possible association of Chlamydia pneumoniae infection and acute myocardial infarction in patients younger than 65 years of age. **Chest.**; v. 112(2); p. 309-12; 1997
64. THOM, D. H.; GRAYSTON, J.T.; WANG, S.P.; SISCOVICK, D.S.; STEWART, D.K.; WEISS, N.S. Chlamydia pneumoniae strain TWAR antibody and angiographically demonstrated coronary artery disease. **Arterioscler Thromb.**, v. 3, p. 547-51, 1991.
65. NIETO, F.J.; FOLSOM, A.R.; SORLIE, P.D.; GRAYSTON, J.T.; WANG, S.P.; CHAMBLESS, L.E. Chlamydia pneumoniae infection and incident coronary heart disease: the atherosclerosis risk in communities study (ARIC). **Am J Epidemiol**; v. 150; p. 149-56; 1999.
66. TAYLOR-ROBSON, D.; BOMAN, J. The failure of antibiotics to prevent heart attacks. **BMJ**; v. 331(7513); p. 361-2; 2005.
67. WELLS, B.J.; MAINOUS, A.G.; DICKERSON, L.M. Antibiotics for the secondary prevention of ischemic heart disease. **Arch Intern Med**; v. 164; p. 2156-61; 2004.
68. ANDRAWS, R.; BERGER, J.S.; BROWN, D.L. Effects of antibiotic therapy on outcomes of patients with coronary artery disease: a meta-analysis of randomized controlled trials. **JAMA**; v.293(21), p.2641-7; 2005.
69. TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos**. 3ª ed.. Ed Atheneu: Rio de Janeiro, 2002. 527 p.

70. GIEFFERS, J.; FULLGRAF, H.; JAHN, J. Chlamydia pneumoniae infection in circulating human monocytes is refractory to antibiotic treatment. **Circulation.**; v.103, p.351-6, 2001.
71. ZHU, J., NIETO, J., HORNE, B.D. Prospective study of pathogen burden and risk of myocardial infarction or death. **Circulation.**; v.103, p.45-51, 2001.
72. GRAYSTON, J.T. Chlamydia pneumoniae and atherosclerosis. **Clin Inf Dis**; v. 40; p. 1131-32, 2005.
73. STACEY, A.; BRADLOW, A.; Arcanobacterium haemolyticum and Mycoplasma pneumoniae co-infection. **Journal of Infection**; v. 38; p.41-2; 1999.
74. HOLLAND, J.F.; FREI, E. **Cancer Medicine**. Boston: Ed Becker B.C. INC, 5 ed, 2000. 2400 p.
75. MOMIYAMA, Y.; OHMORI, R.; TANIGUCHI, H.; NAKAMURA, H.; OHSUZU, F. Association of Mycoplasma pneumoniae infection with coronary artery disease and its interaction with chlamydiae infection. **Atherosclerosis**; v.176, p.139-44, 2004.