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

Participação da resposta inflamatória induzida por *Chlamydophila pneumoniae* e *Mycoplasma pneumoniae* no infarto agudo do miocárdio

Lidio Gonçalves Lima Neto

São Paulo
2011

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

Lima Neto, Lidio Gonçalves
L732p Participação da resposta inflamatória induzida por *Chlamydophila pneumoniae* e *Mycoplasma pneumoniae* no infarto agudo do miocárdio / Lidio Gonçalves Lima Neto. -- São Paulo, 2010.
1v.(paginação irregular)

Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
Orientador: Hirata, Mario Hiroyuki

1. Diagnóstico molecular : Medicina 2. Biologia molecular 3. Inflamação : Medicina 4. Infarto do miocárdio : Medicina I. T. II. Hirata, Mario Hiroyuki, orientador.

616.0756 CDD

Lidio Gonçalves Lima Neto

Participação da resposta inflamatória induzida por *Chlamydophila pneumoniae* e *Mycoplasma pneumoniae* no infarto agudo do miocárdio

Comissão Julgadora
da
tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Tit. Mario Hiroyuki Hirata
Orientador/Presidente

1° examinador (a)

2° examinador (a)

3° examinador (a)

4° examinador (a)

São Paulo, 14 de Abril de 2011

"Confia os teus cuidados ao Senhor, e ele te susterá;
jamais permitirá que o justo seja abalado"

(Salmo 55:22)

Este trabalho é dedicado...

À Deus, a razão de tudo que faço

Aos meus pais, Emilton de Carvalho Lins e Alaide de Alencar Lima Lins que sofrem e lutam comigo, mesmo distante de mim

A minha noiva Brenna Karoline Sousa Lima pelas palavras de incentivo nos momentos mais difíceis da minha vida

A minha irmã Alzira de Alencar Lima Lins Araújo e seu marido Antonio Araújo Filho pelo apoio e incentivo

Ao querido Professor Mario H. Hirata, pois sei que possui uma filosofia de vida muito bonita e por ter me dado essa oportunidade profissional

À Professora Titular Rosário D.C.Hirata, pelo exemplo de profissionalismo

Aos meus amigos, em especial ao André Ducati Luchesi, Vivian Silbiger e Álvaro Cerda pelo companheirismo e pelos momentos alegres que nós passamos juntos.

Agradecimento

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

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida a partir de agosto de 2008.

Ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas de Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em nome do seu chefe, Profa. Tit Marina B. Martinez.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Farmácia – Área de Anãlises Clínicas, do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Aos médicos do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia de São Paulo, Dr. Marcelo Ferraz Sampaio, Dra Elizabete Santos e Dr. Marcos Paulo, pelo apoio indispensável para que esse trabalho fosse realizado no instituto.

Aos médicos da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, Dra. Sandra Regina S Sprovieri e Dr Edson Braga pelo apoio indispensável para que esse trabalho fosse realizado no instituto.

Aos funcionários do setor de eletrocardiograma do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia de São Paulo pela colaboração indispensável.

À Silvia Colombo e Fabiana Pereira do Laboratório de Virologia na seção de Riquetsias e Chlamydophilas do Instituto Adolfo Lutz, pela colaboração indispensável para conclusão deste estudo.

Aos pacientes envolvidos neste estudo, que contribuíram de maneira anônima para melhor entendimento da possível relação entre agentes infecciosos e infarto agudo do miocárdio.

Especialmente, aos meus amigos do Laboratório de Biologia Molecular Aplicado ao Diagnóstico da FCF-USP sem os quais este trabalho não teria sido possível, tanto pelo apoio técnico como pessoal.

À Cristina Moreno Fajardo pela contribuição técnica, sendo fundamental para o desenvolvimento desta tese.

Aos funcionários da secretaria do Departamento de Análises Clínicas da FCF-USP.

Aos funcionários da Secretaria da Comissão de Pós Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas: Elaine Midori e Jorge Alves de Lima pelo carinho e auxílio profissional.

Às funcionárias do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF-USP pelo seu carinho, atenção e incentivo.

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

SUMÁRIO

Lista de tabelas i

Lista de figuras ii

Lista de abreviaturas v

Resumo 21

Abstract 23

1. INTRODUÇÃO 25

1.1 Agentes Infecciosos e aterosclerose 35

1.1.1 Chlamydophila pneumoniae 37

1.1.2 Mycoplasma pneumoniae 39

2. OBJETIVO GERAL 43

2.1.1 Objetivos específicos 43

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS 45

3.1 Característica do grupo IAM 45

3.2 Características do grupo controle 46

3.3 Aspéctos Éticos 46

3.4 Amostras biológicas 47

4 MÉTODOS 49

4.1 Coleta de dados clínicos 49

4.2 Avaliação de fatores de risco cardiovascular 49

4.3 Perfis bioquímicos e hematológicos 51

4.4 Extração e análise de DNA genômico 52

4.5 Pesquisa do rDNA 16S do agente infeccioso 52

4.5.1 Cepas de bactérias 52

4.5.2 Amplificação do fragmento rDNA 16S das bactérias 53

4.5.3 Preparação de células competentes 54

4.5.4 Clonagem dos amplicons em vetor plasmidial 54

4.5.5 Transformação de células *E. coli* competentes com plasmídeo recombinante 55

4.5.6 Extração do DNA plasmidial 55

4.5.7 Uso do controle interno na amplificação rDNA 16S bacteriano 57

4.5.8 PCR em tempo real para detecção de agentes infecciosos 59

4.5.9 Sequenciamento de DNA 60
4.6 Extração e análise de RNA total de leucócitos de sangue periférico 62
4.7 Análise da expressão de RNAm pela PCR em tempo real 63
4.8 Análise de polimorfismos genéticos pela PCR em tempo real 67
4.9 Pesquisa de anticorpos anti-*C. pneumoniae* 72

5. ANÁLISE ESTATISTICA 73

6. RESULTADOS 75
6.1 Casuística 75
6.2 Parâmetros Bioquímicos 76
6.3 Positividade para agentes infecciosos e Infarto agudo do miocárdio 78
6.4 Associação entre expressão gênica e infarto agudo do miocárdio 81
6.5 Associação entre positividade dos agentes infecciosos, imunoglobulinas e expressão gênica 82
6.6 Associação entre positividade dos agentes infecciosos e os marcadores inflamatórios 85
6.7 Associação entre frequencia genotípica dos polimorfismos e IAM 86
6.8 Associação entre os polimorfismos -308G>A do gene da *TNF-α*, -260C>T do gene *CD14*, Asp299Gli e Thr399Ile do gene *TLR4* e Arg753Gln *TLR2 do gene TLR2* e positividade para agentes infecciosos 89
6.9 Associação entre os polimorfismos -308G>A *TNF-α*, -260C>T *CD14*, Asp299Gli *TLR4*, Thr399Ile *TLR4* e Arg753Gln *TLR2* e expressão dos genes TLR4, IL-6, TLR2 e TNF-α 90
7 DISCUSSÃO 91
7.1 Valores bioquímicos e hematológicos 94
7.2 Associação entre agentes infecciosos e infarto agudo do miocárdio 97
7.2.1 *Chlamydophila pneumoniae* 99
7.2.2 *Mycoplasma pneumoniae* 102
7.3 Associação entre polimorfismos em genes inflamatórios e infarto agudo do miocárdio 104
7.3.1 CD14 105
7.3.2 TLRs 106
7.3.3 TNF-α 107
7.4 Associação entre expressão gênica da IL-6, TNFA, TLR2/TLR4 e Infarto Agudo do Miocárdio 108
8. CONCLUSÕES 111
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 113

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Iniciadores utilizados na PCR para amplificação da região rDNA 16S das bacterias 54

Tabela 2 Iniciadores e sondas utilizados na da PCR em tempo real para amplificação da região rDNA 16S das bactérias 57

Tabela 3 - Iniciadores utilizados na PCR para amplificação do plasmídeo recombinante (pGEM-*Cp* e PGEM-*Mp*) 62

Tabela 4 - Iniciadores e sondas utilizados na PCR em tempo real para quantificação da expressão de RNAm 65

Tabela 5 - Valores de inclinação da curva e eficiência dos ensaios da qPCR para analise da expressao de RNAm 67

Tabela 6 - Iniciadores utilizados nos ensaios da PCR em tempo real para detecção de polimorfismos genéticos 68

Tabela 7 - Iniciadores utilizados na PCR para sequenciamento dos amplicons 69

Tabela 8 - Dados biodemográficos dos indivíduos de acordo com os grupos estudados 76

Tabela 9 - Dados bioquímicos e hematológicos dos grupos de pacientes com infarto agudo do miocárdio (IAM) e indivíduos controles (GC)..... 77

Tabela 10 - Distribuição da freqüência de positividade de Chlamydophila pneumoniae (CP) e Mycoplasma pneumoniae (Mp) detectada pela PCR em tempo real nos grupos IAM e controle 79

Tabela 11 - Características clínicas com base na positividade de *Chlamydophila pneumoniaenos* em pacientes IAM e indivíduos controles..... 80

Tabela 12 - Distribuição da freqüência de positividade de Chlamydophila pneumoniae (CP) detectada por imunofluorêscencia indireta (IFI) nos grupos IAM e controle 81

Tabela 12 - Expressão de mRNA dos genes TLR4, IL6, TLR2 e TNF-α em células do sangue periférico de indivíduos que tiveram IAM e controles..... 81

Tabela 13 - Associação entre positividade para DNA de *Cp* e a expressão de mRNA dos genes TLR4, IL6, TLR2 e TNF-α em células do sangue periférico de indivíduos do grupo IAM..... 83

Tabela 14 - Associação entre positividade para DNA de *Mp* e a expressão de mRNA dos genes TLR4, IL6, TLR2 e TNF-α em células do sangue periférico de indivíduos do grupo IAM..... 83

Tabela 15 - Associação entre positividade para IgG na diluição1:16 anti-*Chlamydophila pneumoniae* e a expressão de mRNA dos genes TLR4, IL6, TLR2 e TNF-α em células do sangue periférico de indivíduos do grupo IAM 84

Tabela 16 - Associação entre positividade para IgG na diluição1:512 anti-*Chlamydophila pneumoniae* e a expressão de mRNA dos genes TLR4, IL6, TLR2 e TNF-α em células do sangue periférico de indivíduos do grupo IAM 84

Tabela 17 - Distribuição da freqüência genotípica dos SNPs -260C>T *CD14*, Asp299Gli, Thr399Ile *TLR4* e -308G>A *TNF-α* nos grupos IAM e controle..... 88

Tabela 18 - Equilíbrio de Hardy-weinberg para os polimorfismos estudados 89

Tabela 19 - Associação entre o polimorfismo -260C>T CD14 e a expressão de mRNA dos genes TLR4, IL6, TLR2 e TNF-α em células do sangue periférico de indivíduos do grupo IAM..... 90

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Modelo esquemático da contribuição do processo inflamatório para a manifestação do infarto agudo do miocárdio 27

Figura 2 - Mecanismos de reconhecimento dos ligantes pelo TLR. Este reconhecimento ocorre devido à interação do TLR com outras proteínas, principalmente com o CD14. Retirado de SHRODER, 2005 30

Figura 3 - Mecanismos de sinalização por TLR. Duas vias 1. Via dependente de MyD88 e 2. Independente de MyD88. Retirado de ARMANT, 2002 32

Figura 4 - Modelo esquemático da localização dos principais polimorfismos do *TLR2 e TLR4*. Retirado de SCHRODER, 2005 34

Figura 5 - Potenciais mecanismos das infecções no desenvolvimento da aterosclerose resultando no IAM 37

Figura 6 - Amplificação de diluiçoes seriadas do plasmídeo recombinante *pGEM-Cp* (controle interno para *C. Pneumoniae*) pela PCR em tempo real 59

Figura 7 - Amplificação da região rDNA16S *C. penumoniae* de amostras de DNA de pacientes com IAM 60

Figura 8 - Eletroferograma do sequenciamento da região rDNA16S de *C. pneumoniae* presente de uma amostra de paciente com IAM 62

Figura 9 - Curvas de dissociação da PCR-HRM do polimorfismo *TLR2* Arg753Gln (G+2258A) 70

Figura 10 - Curvas de dissociação da PCR-HRM do polimorfismo TLR4 Asp299Gli (A+896G) 70

Figura 11 - Curvas de dissociação da PCR-HRM do polimorfismo *TLR4* Thr399Ile (C+1197T) 71

Figura 12 - Curvas de dissociação da PCR-HRM do polimorfismo TNFA -308G>A 71

Figura 13 - Curvas de dissociação da PCR-HRM do polimorfismo *CD14* -260C>T 72

Figura 14 - Associação entre positividade para *Chlamydophila pneumoniae* (Cp) e concentrações séricas de PCRus, IL-6, fibrinogênio e números de leucócitos em indivíduos do grupo IAM 85

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
APO AI	Apoliproteína AI
APO B	Apoliproteína B
Arg	Arginina
Asp	Ácido aspártico
CD14	*Cluster of differentiation 14*
CKMB	creatina quinase fração MB
Cp	*Chlamydophila pneumoniae*
Ct	Ciclo *Threshold*
DAC	Doença arterial coronária
DNA	Ácido desóxiribonucléico
DO	Densidade óptica
EROS	Espécies reativas de oxigênio
FGF-2	Fator de crescimento fibroblástico
Gli	Glicina
GM-CSFs	Fatores estimulatórios de colônias monócito-granulócito
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HRM	High Resolution Melting
IAM	Infarto agudo do miocárdio
IDPC	Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia
Ig	Imunoglobulina
IK-β	Inibidor do fator nuclear kβ
IKK	Complexo quinase do inibidor do fator nulear kβ
IL1R	Receptor de interleucina 1
IL6	Interleucina 6
Ile	Isoleucina
IMC	Índice de massa corpórea
IPTG	Isopropil Beta-D-1-Thiogalactopyranoside
IRF3	Fator regulatório de interferon

LAMPs	Proteínas de membranas associadas aos lipídeos
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LB	Luria-Bertani
LPS	Lipopolissacarídeo
MCP-1	Proteína quimiotática monocitária 1
MIP-1α	Proteína inflamatória de macrófagos 1 alfa
MMP	Metalomieloprotease
Mp	*Mycoplasma pneumoniae*
MyD88	Diferenciação mielóide (88)
NF-κB	Fator nuclear κB
PAI-1	Inibidor do ativador do plasminogênio
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
RFLP	Polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição
PCR	Reação em cadeia pela polimerase
qPCR	Reação em cadeia pela polimerase em tempo real
PCRUS	Proteína C reativa ultra sensível
PDAY	Determinantes patobiológico da aterosclerose em jovens
RNAm	Ácido ribonucléico mensageiro
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SNP	polimorfismo de base única
TIRAP	Proteína adaptadora contendo domínio do receptor interleucina-toll
TRIF	P*ro*teína adaptadora contendo um domínio indutor do IFN-β
T4	Tiroxina 4
Thr	Treonina
TLR	Receptores *Toll-like*
TSH	Hormônio estimulante da tireóide
TGF-β	Fator de crescimento transformador beta
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside

LIMA NETO, L. G. **Participação da resposta inflamatória induzida por *Chlamydophila pneumoniae* e *Mycoplasma pneumoniae* no infarto agudo do miocárdio.** São Paulo, 2011 [Tese de Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Farmácia – Área de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo].

RESUMO

Os agentes infecciosos têm sido considerados iniciadores da desestabilização da placa de ateroma. Este mecanismo pode estar relacionado a uma intensificação do processo inflamatório através da interação dos receptores de membrana CD14 e TLR com os microorganismos. Para avaliar esta hipótese, estudou-se a participação da resposta inflamatória induzida por *Chlamydophila pneumoniae* (*Cp*) e *Mycoplasma pneumoniae* (*Mp*) em indivíduos com infarto agudo do miocárdio (IAM). Avaliou-se também, a possível associação entre polimorfismos dos genes *CD14*, *TLR2*, *TLR4* e *TNFA* e a expressão dos genes *IL6*, *TLR2*, *TLR4* e *TNFA* em leucócitos do sangue periférico, assim como a sua associação com o IAM. Para isso, foi realizado um estudo caso-controle constituído por pacientes com IAM e por indivíduos sem evidência de doença cardiovascular (grupo controle). As imunoglobulinas IgM e IgG séricas anti-Cp foram detectadas por imunofluorescência indireta. O DNA dos agentes infecciosos foi detectado no sangue periférico pela PCR em tempo real. A genotipagem dos polimorfismos *TNFA* -308G>A, *IL6* -174G>C, *CD14* -260C>T, *TLR4* (Asp299Gli e Thr399Ile) e *TLR2* Arg753Gln e a quantificação relativa da expressão gênica nas células sanguíneas foram analisados pela PCR em tempo real. A porcentagem de positividade para DNA de *Cp* foi de 18,0% e 8,1% nos grupos IAM e controle (p=0,071), respectivamente, (p=0,071). Foram positivos para DNA de *Mp*, 5,0% e 11,2% dos indivíduos nos grupos IAM e controle, respectivamente (p=0,318). Sete indivíduos (7,1%) do grupo IAM tiveram títulos anti-*Cp* IgG positivos (1:512) e 3,9% dos indivíduos do grupo controle (p=0,718). A expressão do *TLR4* foi significantemente menor no grupo IAM (0,00113±0,00102) comparado ao grupo controle (0,00144±0,000806; p=0,003). As frequencias genotípicas e alelicas dos polimorfismos *TNFA* -308G>A, *CD14* -260C>T, *TLR4* (Asp299Gli e Thr399Ile) e *TLR2* Arg753Gln foram similares entre os grupos estudados (p>0,05) sugerindo que esses polimorfismos não estao

associados com IAM nesta amostra populacional. No grupo IAM, houve associação entre o genótipo -260CT+TT CD14 com títulos IgG anti-*Cp* detectados na diluição 1:16 (p=0,042). Da mesma forma, o alelo A do polimorfismo -308G>A TNF-α foi associado com títulos positivos de IgG anti-*Cp* na diluição 1:512 (p=0,0058). No grupo IAM, pacientes positivos para DNA de *Cp* tiveram maiores concentrações de fibrinogênio do que pacientes negativos para este agente infeccioso (541,8±161,5mg/dL e 450,5±196,8mg/dL, respectivamente; p=0.043). Os agentes infecciosos *Chlamydophila pneumoniae* e *Mycoplasma pneumoniae* não foram significantemente mais frequentes em indivíduos que tiveram infarto agudo do miocárdio em relação ao grupo controle, porém houve uma associação, no grupo IAM, entre positividade para DNA de *C. pneumoniae* e concentrações mais elevadas de fibrinogênio.

ABSTRACT

Atheroma plaque instability has been attributed to the presence of some infectious agents. This mechanism may be related with increased stimulus of inflammatory process through interactions of CD14 and TLR with infectious agents. In this present study, it was evaluated the association of the presence of *Chlamydophila pneumoniae* and *Mycoplasma pneumonia* with acute myocardial infarction (AMI). A case-control study was conducted with AMI patients and non-AMI individuals as controls. Immunoglobulin G (IgG) and IgM antibodies anti-*Chlamydophila pneumoniae* were detected by indirect immunifluorescent assay and the *Cp* DNA and *Mp* DNA were detected by real time PCR (RT-PCR) in peripheral blood cells. Using the same method, the individuals were genotyped and the gene expressions of TLR2, TLR4, IL-6 e TNF-α were evaluated by RT-qPCR. In AMI patients, Cp DNA and Mp DNA were positive in 18,0% and 5,0% samples, respectively. In controls, 8,1% and 11,2% were positive for *Cp* DNA and *Mp* DNA, respectively. TLR4 expression was significantly decreased in AMI patients (0.00113±0.00102) compared with controls (0.00144±0.000806; p=0.003). The frequencies of -308G>A *TNF*-α, -260C>T *CD14*, Asp299Gli *TLR4*, Thr399Ile *TLR4* e Arg753Gln *TLR2* SNPs in AMI group were similar to those found in controls. On the other hand, In AMI group, the -260CT+TT *CD14* genotype was associated with anti-CP IgG antibody titer of 1/16. Likewise, the rare allele of -308G>A *TNF-α* was associated with anti-CP IgG antibody titer of 1/16. Cp DNA positive patients had high concentration of fibrinogen when compared with negative patients. In conclusion, Cp DNA and Mp DNA positivity were not associated with AMI.

1 - INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares constituem atualmente a principal causa de morte e incapacitação dentre as doenças humanas, correspondendo a aproximadamente um sexto das mortes na população adulta (Lloyd-Jones et al., 2010). Dentre estas mortes, o infarto agudo do miocárdio é a manisfestação clínica mais prevalente, sendo que quase todos os casos de infartos do miocárdio resultam do processo aterosclerótico nas artérias coronárias, geralmente com trombose coronária sobreposta.

A aterosclerose é resultado de alterações vasculares que evoluem de forma lenta e progressiva, levando a obstrução parcial ou completa do lúmem da artéria se manifestando como um evento agudo (Libby and Theroux, 2005; Akasaka et al., 2010).

A gênese da lesão aterosclerótica da artéria coronária é um assunto controverso e complexo, e vários fatores de risco têm sido associados com o seu início e desenvolvimento. Atualmente, entende-se o processo aterosclerótico não apenas como decorrência do acúmulo de lípides nas paredes dos vasos, mas também como conseqüência da disfunção endotelial e da ativação do sistema inflamatório (Libby et al., 2010). A agressão ao endotélio provoca uma resposta inflamatória crônica na parede arterial e esta é a hipótese mais aceita para a etiopatogenia da aterosclerose. Esta resposta inicia-se por alguma forma de lesão do endotélio devido a forças mecânicas associadas como a hipertensão arterial, toxinas exógenas como aquelas encontradas no tabaco, proteínas anormalmente glicadas associadas com os diabetes melito, lípides ou proteínas modificadas por oxidação e, possivelmente, infecções virais e bacterianas. (Tiong and Brieger, 2005; Damy et al., 2009; Akasaka et al., 2010).

A lesão do endotélio resulta em sua disfunção, aumento da permeabilidade e da adesão de monócitos e macrófagos no endotélio vascular. Subsequentemente ocorre a deposição de lipoproteínas na camada íntima da artéria, principalmente as lipoproteínas de baixa densidade (LDL), ricas em colesterol e as lipoproteínas de muita baixa densidade (VLDL) bem como suas formas modificadas por oxidação (Tiong and Brieger, 2005). Os leucócitos mononucleares após entrarem no ateroma nascente, por meio de adesão às células endoteliais e penetração na camada íntima por diapedese entre as junções intercelulares, iniciam a captação de lípides modificados, principalmente o LDL-oxidado pelas espécies reativas de oxigênio (EROS), produzido pelo estresse oxidativo, e conferindo aos macrófagos o aspecto de células espumosas e favorecendo, sua retenção na placa (Hwang et al., 2011).

Entre as alterações causadas pela presença de LDL-oxidado está também a produção de interleucina-1 (IL-1) e interleucina-6 (IL-6), que estimula a migração e proliferação das células musculares lisas da camada média arterial. Estas, ao migrarem para a íntima, passam a produzir não só citocinas como também componentes da matriz extracelular que formará parte da capa fibrosa da placa (Libby and Theroux, 2005; Akasaka et al., 2010). As células do músculo liso produzem uma grande quantidade de componentes da matriz extracelular, incluindo colágeno, elastina e vários tipos de proteoglicanas durante o processo inflamatório como mecanismo de reparo do tecido lesado (Libby and Theroux, 2005). Além dessas substâcias, os fatores de crescimento também produzidos pelas células do músculo liso, dentre eles, o TGF-β, PDGF, FGF-2 também participam do mecanismo de reparo do tecido lesado. A proliferação e a síntese de colágeno tipo 1 na matriz extracelular implicam em um

processo lento e progressivo de crescimento da placa, culminando na estabilização da placa pela formação de uma cápsula fibrosa envolvendo o ateroma. Porém, muitos mediadores produzidos por macrófagos e linfócitos T ativados promovem um efeito desestabilizante na placa (Hansson, 2005). O processo de apoptose pode ser ativado por mediadores inflamatórios e este processo é reconhecido como um mecanismo de morte de células espumosas na placa (Deguchi et al., 2006). A apoptose celular pode levar a uma ruptura da placa de ateroma. Em adição, durante a inflamação, um importante mecanismo de desintegração da placa é iniciado com degradação da matriz extracelular por metaloproteinases (MMP), como a colagenase intersticial MMP1, a estromalisina MMP3 e as gelatinases MMP2 e MMP9 (Libby, 2002; Deguchi et al., 2006).

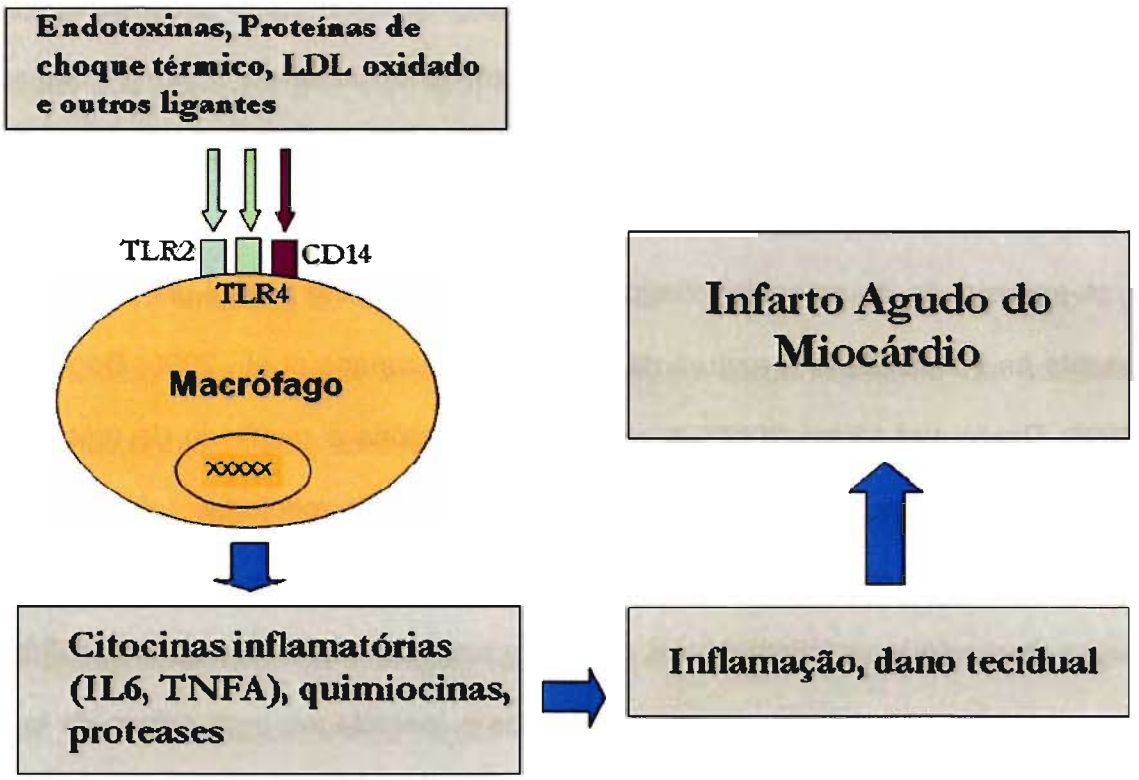

Figura 1. Modelo esquemático da contribuição do processo inflamatório para a manifestação do infarto agudo do miocárdio (Libby et al., 2009).

Quando a placa apresenta uma cápsula espessa torna-se menos propensa a ruptura. As placas fibrosas são clinicamente estáveis e podem ser constituídas ou não de pequena quantidade de lipídeos extracelulares (Yeghiazarians et al., 2000; Rosso et al., 2005; Post and Munzel, 2010). Na artéria coronária, muitas dessas lesões permanecem clinicamente silenciosas ou podem progredir lentamente para uma angina de peito estável. Uma placa é considerada vulnerável (ou imatura) quando apresenta risco de ruptura e é caracterizada por grande quantidade de lipídeos e cápsula fibrosa delgada ou macroscopicamente ausente (Post and Munzel, 2010). A ruptura dessa placa poderá ocasionar uma obstrução parcial ou total do lúmen da artéria através da formação de um coágulo sangüíneo. Quando ocorre a ruptura da placa, existe exposição de colágeno e fragmentos de tecido conjuntivo da região subendotelial. As plaquetas, células do sangue, aderem e agregam-se ao local da ruptura, liberando substâncias que desencadeiam o processo de coagulação, resultando na formação do trombo (Ishii and Yoshida, 2011).

A intensidade da resposta inflamatória local e sistêmica possui um papel muito importante na instabilidade e ruptura da placa (Yeghiazarians et al., 2000; Deguchi et al., 2006; Croce and Libby, 2007). A resposta inflamatória é resultado de uma lesão tecidual que imediatamente produz fenômenos vasculares mediados principalmente pela histamina. Os resultados são o aumento da perfussão sanguínea e estímulo à produção de mediadores inflamatórios, que promovem um aumento da permeabilidade capilar e também quimiotaxia atraindo neutrófilos e macrófagos para o foco da lesão (Libby, 2002). Estas células por sua vez fagocitam os elementos que estão na origem

da inflamação e produzem mais mediadores químicos dentre os quais estão as citocinas, como por exemplo o fator de necrose tumoral α (TNFα) e as interleucinas, quimiocinas, bradicinina, prostaglandinas e leucotrienos (Sbarsi et al., 2007).

Dentre os principais receptores envolvidos no processo inflamatório estão às proteínas *Cluster of differentiation 14* (CD14) e os receptores *Toll-like* (TLR) (Figura 2). Estas proteínas são capazes de interagir com componentes celulares de microorganismos apresentando uma grande importância no reconhecimento de patógenos e no desenvolvimento de uma resposta inflamatória (Armant and Fenton, 2002; Fernandez-Real et al., 2003; Romano Carratelli et al., 2009).

O CD14 é uma glicoproteína de 55 kDa que reconhece diversos ligantes, como lipopolissacarídeos e peptidoglicanos (Stelter, 2000). Esta glicoproteína é expressa principalmente na superfície de células mielóides e tem como principal função a ativação dos TLR (Wang et al., 1995; Takeda, 2010).

O TLR-4 é uma proteína transmembrana que reconhece ligantes como proteínas de choque térmico, LDL oxidada e lipopolissacarídeos, desencadeando um processo inflamatório (Hansson, 2005; den Dekker et al., 2010). Além do TLR-4, o TLR-2 também desempenha uma função importante no reconhecimento de substâncias endógenas e exógenas e este receptor reconhece componentes celulares de bactérias gram-negativas, gram-positivas e alguns vírus (Frantz et al., 2008; Erridge, 2010).

É através de sua região extracelular que os TLR reconhecem seus ligantes diretamente ou através da interação com o CD14 (Figura 2) (Schroder and Schumann, 2005). Os TLR possuem uma região intracelular no citoplasma que é homóloga ao receptor de interleucina 1 (IL1R), incluindo um domínio conservado de

aproximadamente 200 aminoácidos, denominado Toll-IL1R. Além desta estrutura similar, TLRs e IL1R também possuem uma molécula adaptadora em comum, a diferenciação mielóide 88 (MyD88) (Figura 3), que também contém um domínio Toll-IL1R (Takeda and Akira, 2005, 2007).

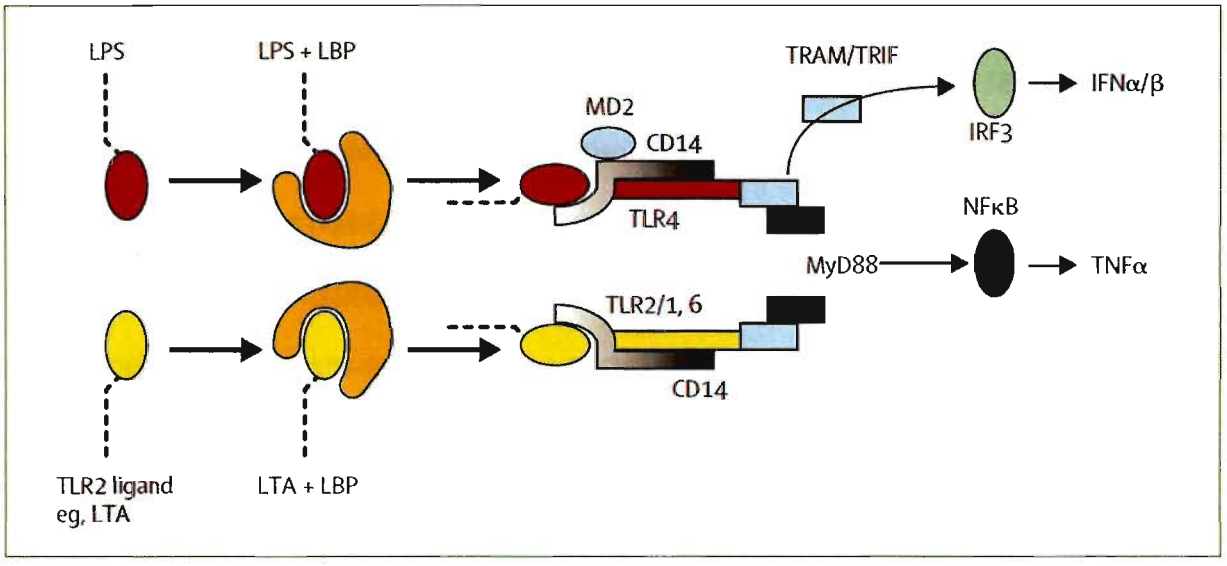

Figura 2. Mecanismos de reconhecimento dos ligantes pelo TLR. Este reconhecimento ocorre devido à interação do TLR com outras proteínas, principalmente com o CD14. Retirado de SHRODER, 2005.

Uma vez o TLR ativado ocorre ativação de moléculas de adaptação e, consequentemente, do complexo quinase do inibidor do fator nulear kβ (IK-β), denominada IKK. A fosforilação mediada por IKK resulta na ubiquitinação e fosforilação do IK-β e posteriormente, o fator nuclear-κB (NF-κB) deixará de ser inibido ocorrendo a sua translocação para o núcleo. Este processo permite a expressão de vários genes pró-inflamatórios, como a interleucina-6 (IL-6) (Figura 3) (Takeda and Akira, 2007). Existe uma outra via de sinalização do TLR que é a via independente do MyD88. Por esta via ocorre a ativação da Proteína adaptadora contendo domínio do receptor

interleucina-toll (TIRAP), da proteína adaptadora contendo um domínio TIR e indutora do IFN-β (TRIF) e do fator regulatório de interferon (IRF3), que ativam a expressão de genes inflamatórios (Kaisho and Akira, 2006).

A IL-6 é uma citocina que estimula a resposta de fase aguda do fígado a infecções e ao dano tecidual, incluindo a estimulação da expressão de proteína C reativa, do inibidor do ativador do plasminogênio (PAI-1) e do fibrinogênio (Bennet et al., 2003). A IL-6 está relacionada também à diferenciação e ativação de macrófagos e linfócitos T e B (Terry et al., 2000). O gene que codifica IL-6 não tem expressão constitutiva significativa, mas é altamente expressa por várias células como monócitos/macrófagos, fibroblastos, células endoteliais, adipócitos e células T em situações de sepse (Tsezou et al., 2008).

O TNF-α é uma citocina pró-inflamatória que é reconhecida por divervos tipos celulares, como as células endoteliais, que resulta na ativação da sinalização para expressão de moléculas de adesão em leucócitos e consequentimente promove a migração sub-endotelial de leucócitos (Gu et al., 2006; Zeng et al., 2009).

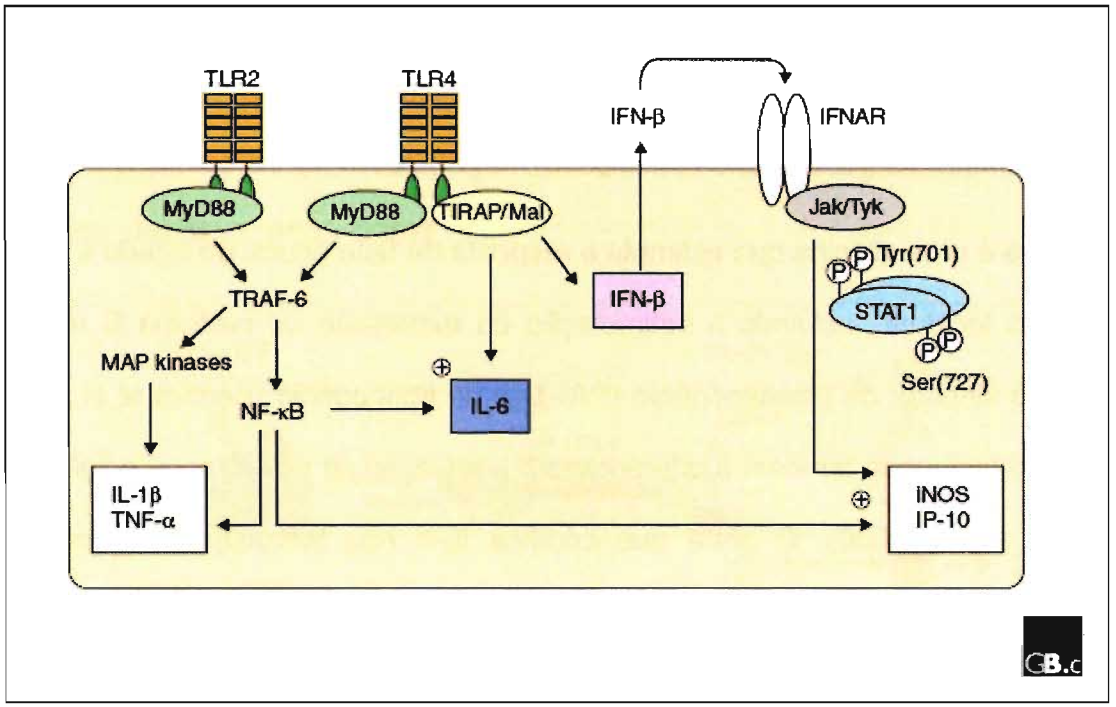

Figura 3. Mecanismos de sinalização por TLR. Duas vias 1. Via dependente de MyD88 e 2. Independente de MyD88. Retirado de ARMANT, 2002.

Os receptores CD14, TLR e as citocinas IL-6 e TNF-α, portanto, estão diretamente envolvidos no processo inflamatório e alterações nos seus genes podem comprometer a sinalização intra e intercelular necessária para o desenvolvimento deste processo (Tsung et al., 2007; Dehus et al., 2008; Unal et al., 2008; Riikola et al., 2009). Diversos estudos descreveram o aumento da expressão dos receptores de membrana TLR e CD14 durante o infarto do miocárdio (Edfeldt et al., 2004; Morange et al., 2005). O aumento das concentrações de IL-6 e TNF-α no infarto do miocárdio foi descrito por vários estudos que mostraram que estes seriam marcadores de eventos coronários futuros em indivíduos saudáveis e sua elevação correlaciona-se à maior mortalidade em pacientes com síndrome coronariana aguda (Lindmark et al., 2001; Bennet et al., 2003; Carty et al., 2009).

O gene *CD14* está localizado no cromossomo 5, consiste de 3.900 pb organizados em 2 exons e codifica uma proteína de 375 aminoácidos (Hubacek et al., 1999). Um dos polimorfismos do *CD14* mais importantes é a substituição de citosina por timina no nucleotídeo 260 da região promotora (-260C>T, rs2569190) (Bernardo et al., 2006). Este polimorfismo está associado a diferenças na resposta inflamatória, aumento de concentrações plasmáticas da forma solúvel do CD14 e maior taxa de infecção por *Chlamydophila pneumoniae (Eng et al., 2003; Bernardo et al., 2006).*

O gene que codifica o TLR-4 (*TLR4*) está localizado no cromossomo 9 e por processamento alternativo são transcritas quatro isoformas de RNA mensageiro (RNAm) e a quantidade de exons varia de 3 a 5 (Rock et al., 1998). Um dos polimorfismos do *TLR4* mais importantes é a substituição de adenina por guanina no nucleotídeo +896 que resulta na troca de ácido aspártico por glicina no códon 299, denominado Asp299Gli ou 896A>G, rs4986790 (Schroder and Schumann, 2005; Takeda and Akira, 2005). Este polimorfismo, localizado no último exon, altera o domínio extracelular do TLR-4 dificultando o reconhecimento de patógenos, sendo este associado à alteração da resposta inflamatória (van der Graaf et al., 2005) e a maior susceptibilidade a infecções (Schroder and Schumann, 2005). Além deste outros polimorfismos que alteram o domínio extracelular do TLR-4 estão associados a uma alteração do processo inflamatório e à susceptibilidade a infecções, como o polimorfismo *TLR4* Thr399Ile (Schroder and Schumann, 2005). Este se localiza no último exon do *TLR4*, e é resultado da substituição de citosina por timina no nucleotídeo +1197 que resulta na troca de treonina por interleucina no códon localizado no aminoácido 299, também denominado 1197C>T, rs4987233 (Figura 4).

O receptor toll-like 2 (TLR2) é uma proteína transmembranar pertencente à família dos recetores Toll. O TLR2 age como receptor funcional para tanto para reconhecimento de bactérias gram-positivas, quanto para as bactérias gram-negativas (Fan et al., 2009). Tal como todos os outros membros da família TLR, o TLR2 é composto de um domínio extracelular contendo várias leucinas, uma região transmembranar, e uma cauda citoplasmática conservadas contendo um domínio TIR. O gene que codifica o TLR-2 (*TLR2*) está localizado no cromossomo 4, possuindo 1 exon e 3224 pares de nucleotídeos. O *TLR2* codifica uma proteína com 784 aminoácidos e de um peso molecular de 84 kDa. O polimorfismo do *TLR2* denominado Arg753Gln, rs5743709 foi associado com uma maior suceptibidade a infecções, sendo esta a possível relação deste polimorfismo com o infarto agudo do miocárdio (Schroder and Schumann, 2005; Poikonen et al., 2009).

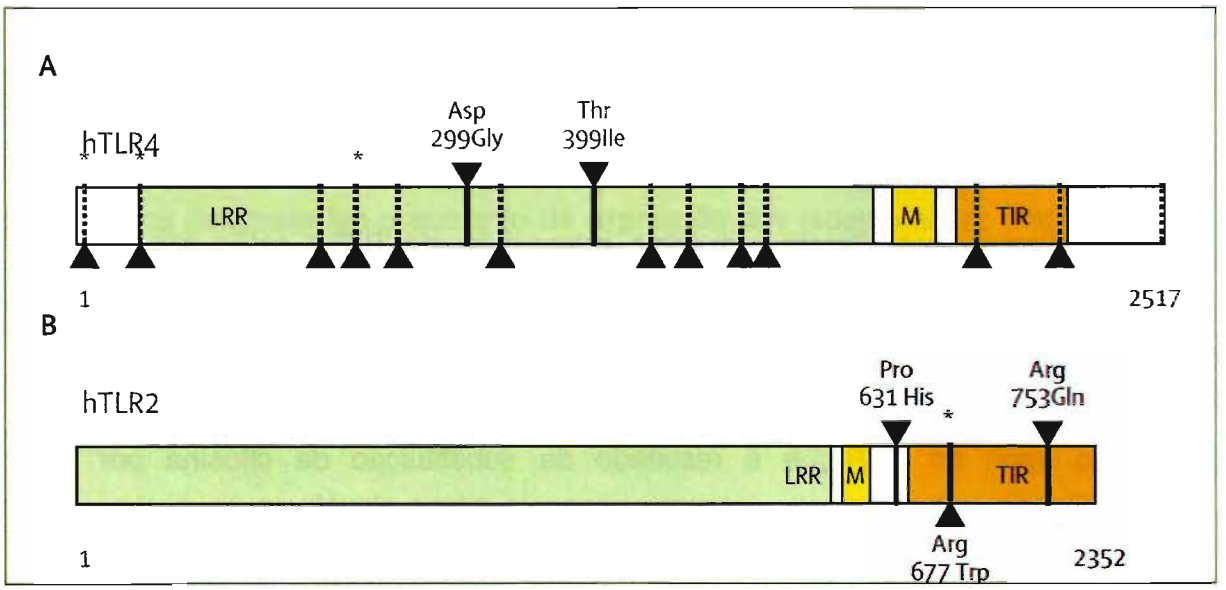

Figura 4. Modelo esquemático da localização dos principais polimorfismos do *TLR2 e TLR4*. Retirado de SCHRODER, 2005.

O gene que codifica o *TNF* -α está localizado no cromossomo 6, possuindo quatro exons e 1676 nucleotídeos. Variações da expressão de TNF-α em humanos como consequência de polimorfismos do *TNFA* foi demonstrado em vários estudos, sendo a principal alteração a substituição de uma guanina por uma adenina no nucleotídeo -308 na região promotora do *TNF*-α (Keso et al., 2001) (Elahi et al., 2009). Ghaderian et al demonstraram uma associação entre este polimorfismo com o infarto agudo do miocárdio, sugerindo que esta associação aconteceria devido a um aumento significativo do estímulo inflamatório em pacientes portadores do alelo raro A (Ghaderian et al., 2010).

1.1 Agentes Infecciosos e aterosclerose

Desde os primeiros relatos sobre lesões ateroscleróticas e, principalmente, nos últimos trinta anos, avanços extraordinários foram obtidos referentes aos mecanismos celulares e moleculares da aterogênese. Esses avanços desenvolvem-se em paralelo ao crescimento da compreensão da Biologia Vascular, homeostase e metabolismo lipídico (Loscalzo et al., 2005). A interação inflamação-infecção na aterogênese, também, é de fundamental importância para os avanços neste processo, o qual é complexo e multifatorial. Infecções bacterianas, tais como: *C. pneumoniae*, *M. pneumoniae*, podem desencadear a secreção de citocinas inflamatórias, conduzindo à aterogênese.

As infecções representam o possível vínculo entre a doença arterial coronariana e os bem reconhecidos riscos associados com marcadores inflamatórios circulantes,

tais como a proteína C reativa, fibrinogênio, amilóide sérico, IL-6 e TNF-α (Kuo and Campbell, 2003; Jha et al., 2009).

Estudos em humanos sugeriram que a infecção pode predispor à aterosclerose. Nesses estudos, foram detectados agentes infecciosos na parede dos vasos com lesão aterosclerótica, além disso, foi estabelecida relação entre titulos altos de Imunoglobulina G (IgG) contra agentes infecciosos e a aterosclerose (Ieven and Hoymans, 2005; Schrijvers et al., 2007; Jha et al., 2009).

A aterogênese poderia ser iniciada por um agente infeccioso ao lesar o endotélio vascular, diretamente por invasão da íntima do vaso, ou indiretamente através da liberação de lipopolissacarídeo (LPS) sistemicamente, com subseqüente ativação de citocinas pró-inflamatórias. Os microorganismos também poderiam levar a aceleração da aterosclerose em qualquer estágio por aumento do recrutamento de células inflamatórias (macrófagos, linfócitos T) às lesões pré-existentes, como também, poderiam ser levados às lesões ateroscleróticas precoces por monócitos, macrófagos ou linfócitos. Estas celulas estimulam a produção de moléculas de adesão e citocinas pró-inflamatórias, eventualmente, levando a progressão da lesão por aumento do acúmulo de macrófagos na íntima e proliferação das células musculares lisas, todos componentes críticos no desenvolvimento da aterosclerose (Kuo and Campbell, 2003).

Indiretamente, as infecções crônicas poderiam resultar em alterações nos perfis lipídicos sanguíneos através da liberação de citocinas sistêmicas, levando a um ambiente pró-aterogênico. As infecções podem resultar na diminuição ou incapacidade funcional da lipoproteína de alta densidade (HDL) que é anti-aterogênica, como também, no aumento de triglicerídeos e lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL)

que são pró-aterogênicos (Figura 5) (Damy et al., 2009; Fong, 2009).

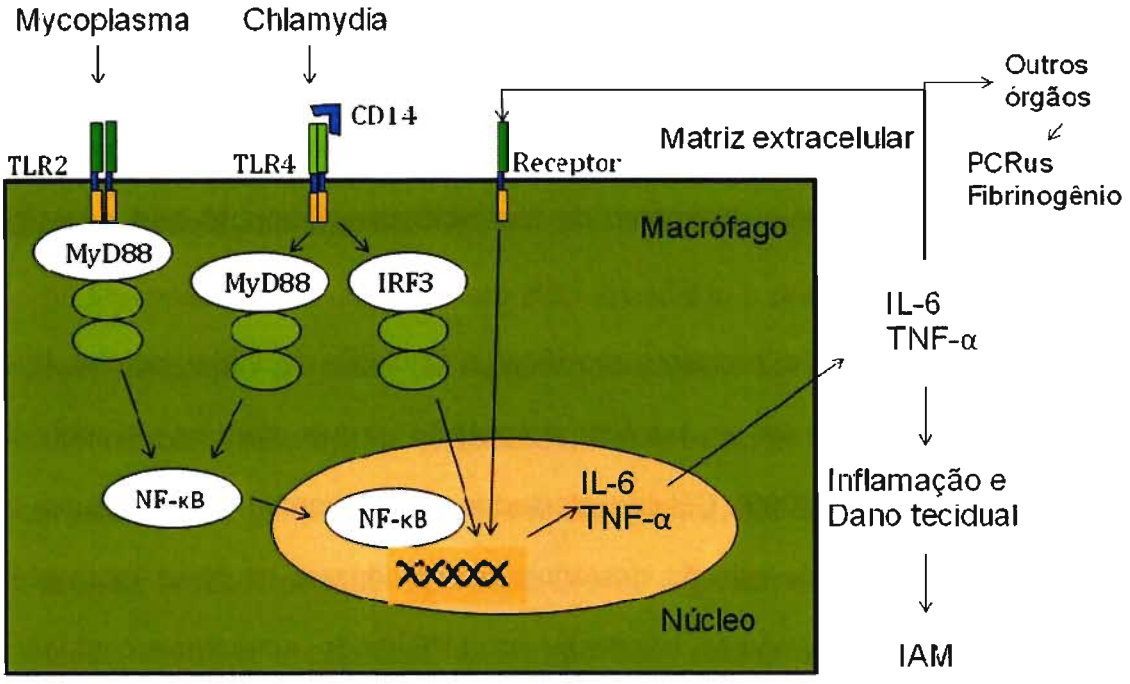

Figura 5. Potenciais mecanismos das infecções no desenvolvimento da aterosclerose resultando no IAM (Campbell et al., 2010).

Teoricamente, as infecções podem potencializar a precipitação aguda de eventos isquêmicos nos estágios finais do desenvolvimento aterosclerótico. Isto poderia ocorrer devido à produção de metaloproteinases que são capazes de degradar todos os tipos de proteínas presentes na matriz extracelular (Sanchez-Escuredo et al., 2010) e por geração de ambiente pró-coagulante, mediado por citocinas inflamatórias, aumentando a produção de plaquetas, fibrinogênio e fator tissular (Fong, 2009).

1.1.1 *Chlamydophila pneumoniae*

O envolvimento da infecção pela *Chlamydophila pneumoniae* foi relatado

sugerindo coadjuvar a manifestação das doenças cardiovasculares. Este é um patógeno procariotc intracelular que pode infectar e sobreviver em uma variedade ampla de células hospedeiras, incluindo epitélio pulmonar, macrófagos, monócitos, células musculares lisas e endotélio vascular (Ieven and Hoymans, 2005). Foi demonstrado que *C. pneumoniae* é capaz de iniciar e propagar a inflamação em meios que contribuem para o desenvolvimento da aterosclerose (Campbell and Kuo, 2004; Palikhe et al., 2009).

C. pneumoniae pode infectar e modificar a fisiologia de várias células típicas presentes na circulação e devem transitar do pulmão para o ateroma via monócitos circulantes (Palikhe et al., 2009). Células infectadas, subsequentemente, possuem uma expressão de moléculas de adesão desregulada e produzem citocinas inflamatórias (Jha et al., 2009). *C. pneumoniae*, intacta ou seu LPS, pode aumentar a captação de LDL por macrófagos humanos para se tornarem células espumosas ricas em éster de colesterol, um componente chave no início da aterogênese. Além do mais, a proteína de choque térmico 60 de *C. pneumoniae* (HSP-60) pode potencializar a oxidação intracelular da LDL, sua forma tóxica, que é considerada mediador primário da aterogênese (Fong, 2009).

Muitos estudos detectaram DNA de *C. pneumoniae* em placas ateroscleróticas por hibridização *in situ* (Higuchi et al., 2000; Damy et al., 2009); pela reação em cadeia da polimerase (PCR) (Palikhe et al., 2008; Palikhe et al., 2009), assim como pela PCR em tempo real (Jha et al., 2009).

No estudo de Guech-Ongey et al. (2006), os pesquisadores não descartaram a possibilidade da *C. pneumoniae* aumentar o risco de eventos secundários

cardiovasculares em pacientes que já possuíam doenças cardíacas (Guech-Ongey et al., 2006). A associação entre *C. pneumoniae* e doença arterial (coronária, carotídea e periférica) foi descrita em estudos soro-epidemiológicos (Momiyama et al., 2004; Jha et al., 2009).

1.1.2 *Mycoplasma pneumoniae*

O *Mycoplasma pneumoniae* tem sido associado à patogênese da aterosclerose e à desestabilização da placa de ateroma possivelmente por exacerbar o processo inflamatório crônico (Momiyama et al., 2004; Damy et al., 2009; Maia et al., 2009). Este microorganismo faz parte do grupo dos Micoplasmas, que é um grupo dos menores e mais simples procariotos auto-replicantes. Estes organismos são diferentes de outras eubactérias em muitos aspectos, tais como pela ausência da parede celular e por apresentarem um genoma bem reduzido (Waites and Talkington, 2004).

A infecção por *M. pneumoniae* ocorre no trato respiratório inferior e superior, em crianças e adultos, em todas as partes do mundo. O clima e área geográfica não têm muita significância para potendializar o risco de infecção. Esta bactéria é transmitida por aerossóis de pessoa para pessoa (Waites and Talkington, 2004; Smith, 2010).

Foi observado que em células epiteliais do trato respiratório o *M. pneumoniae*, para facilitar sua interiorização na célula hospedeira, libera peróxido de hidrogênio e radicais superóxido, que agem concomitantemente com algumas moléculas endógenas induzindo um estresse oxidativo no epitélio do hospedeiro (Waites and Talkington, 2004). Sabe-se que uma das causas para disfunção endotelial nas artérias é o estresse oxidativo.

Os micoplasmas possuem lipoproteínas fixas na porção exterior da membrana plasmática, denominadas de lipídeos associados a proteínas de membranas (LAMPS), altamente antigênicas. Atualmente, as LAMPS têm atraído atenção pela sua abudância nos micoplasmas ao contrário de outras eubactérias (You et al., 2006). Estas proteínas induzem a liberação de citocinas inflamatórias, tais como IL-1β, IL-6, TNF-α e quimiocinas como IL-8, proteína quimiotáxica monocitária (MCP-1), proteína inflamatória de macrófagos 1 alfa (MIP-1α), fator estimulante de colônia de monócito-granulócito (GM-CSF), como também prostaglandinas e óxido nítrico. Especula-se que a injúria nas células hospedeiras não consiste de uma lesão direta, mas sim devido a sua própria imunopatogênese (You et al., 2006; Damy et al., 2009).

M. pneumoniae é um patógeno respiratório comum. Exibe comportamento epidemiológico e suscetibilidade a antibióticos similares ao da *C. pneumoniae*, mas uma característica marcante é a necessidade de colesterol para a sua sobrevivência. Este microorganismo já foi detectado nos centros lipídicos das placas de ateroma presente nas coronárias, juntamente com *C. pneumoniae* (Higuchi Mde and Ramires, 2002).

Os fatores de riscos convencionais para aterosclerose como, por exemplo, hábito de fumar e hipertensão, não completamente explicam a fisiopatogenia desta doença em todos os casos de infarto agudo do miocárdio. Por isso, existe a necessidade de pesquisar novos fatores de riscos que estejam relacionados com o desenvolvimento desta doença. Estudos epidemiológicos têm sugerido que algumas infecções estão associadas com o desenvolvimento do infarto agudo do miocárdio, pois detectaram DNA bacteriano em lesões ateroscleróticas (West et al., 2009; Sakurai-

Komada et al., 2010), além disso, os riscos de ter doenças coronarianas, como o infarto agudo do miocárdio ou angina instável, durante os meses de frio intenso são mais elevados que no verão, isto sugere uma associação entre as infecções respiratórias que aumentam nesta época do ano e esta doença, portanto alguns microorganismos podem provocar uma desestabilização de uma doença coronária pré-existente por ativar a expressão de genes inflamatórios em diversos tipos celulares, contribuindo assim para o rompimento das placas ateroscleróticas pré-existentes nas coronárias causando novos casos de síndrome coronariana aguda. A hipótese de que as bactérias que causam infecções respiratórias podem ser um potencial fator de risco para infarto agudo do miocárdio, nos levanta a proposta de que o provável caminho pelo qual essas bactérias oriundas do trato respiratório cheguem às artérias coronárias seria através das células do sangue periférico que são atraídas a camada íntima da artéria por quimiotaxia. Portanto, este trabalho pesquisou a presença de *M. pneumoniae* e *C. pneumoniae* em células do sangue periférico de pacientes que tiveram infarto agudo do miocárdio (grupo IAM) e de indivíduos controles (grupo controle) e também procurou uma associação com a diferença genética entre os individuos da resposta imune inata por via de sinalização e ativação por TRL e produção de algumas citocinas inflamatórias.

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar a relação entre a presença de infecção por *C. pneumoniae e*/ou *M. pneumoniae* e infarto agudo do miocárdio (IAM), assim como a susceptibilidade genetica.

2.1 Objetivos específicos

- Pesquisar o DNA de *C. pneumoniae e M. pneumoniae* no sangue periférico de pacientes com IAM e indivíduos controles.
- Pesquisar a positividade para IgM e IgG anti-*C. pneumoniae* em pacientes com IAM e em indivíduos controles.
- Descrever as frequencias genotípicas e alelicas dos polimorfismos *TLR2* Arg753Gln, *TLR4* (Asp299Gli e Thr399Ile), *CD14* -260C>T e *TNFA* -308G>A em pacientes com IAM e indivíduos controle.
- Avaliar a associação entre os polimorfismos *TLR2* Arg753Gln, *TLR4* (Asp299Gli e Thr399Ile), *CD14* -260C>T e *TNFα* -308G>A e a expressão de mRNA de *TLR2, TLR4, IL6* e *TNFα* em sangue periférico e a ocorrência de IAM.
- Avaliar a associação entre a expressão de mRNA dos receptores de membrana TLR-2, TLR-4 e das citocinas IL-6 e TNF-α, e concentrações de marcadores inflamatórios (IL-6 e PCRUS) e positividade para os agentes infecciosos, em sangue periférico.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Características do grupo IAM

Foram incluídos 100 indivíduos com idade entre 30 a 65 anos, de ambos os sexos, com diagnóstico de IAM, entre os que são atendidos no Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia (IDPC) e da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo (ISCMSP). O diagnostico de IAM foi estabelecido por pelo menos dois de três critérios definidos pelas diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia (2007). Esses critérios são: a) clínico: relato de dor de localização torácica anterior, em aperto, peso ou queimação, com duração superior a 20 minutos; b) eletrocardiográfico: supradesnivelamento do segmento ST ≥ 1mm, a 0,02 segundos após o ponto J e que evolui para formação de onda Q patológica (infarto Q) (duração > 0,03s e amplitude > 3 mm), ou infradesnivelamento do segmento ST e/ou alterações das ondas T que não evoluem para formação de ondas Q patológicas (infarto não-Q). Estas alterações eletrocardiográficas estavam presentes em pelo menos duas derivações contíguas do eletrocardiograma convencional, incluindo V7 e V8; c) marcadores cardíacos: valores plasmáticos elevados (pelo menos o dobro do valor de referência) de creatina quinase fração MB (CKMB) e troponina T acima do limite superior do valor de referência (0,1 µg/mL) (Conti *et al,* 2002).

Não foram incluídos, no estudo, os pacientes com IAM que apresentaram quaisquer das seguintes condições: Doença crônica em atividade nos últimos dois meses: doenças inflamatórias reumatológicas, doença inflamatória intestinal (Retrocolite ulcerativa e doença de Crohn), insuficiência renal crônica, insuficiência hepática, disturbio endócrino (Hiper e hipotireodismo, diabetes Melito tipo 1 e doença

de Cushing), hipercolesterolemia familial conhecida ou presente em membros da família. Para a determinação dessas condições, além do questionário aplicado ao paciente, foram realizados os seguintes testes de triagem: glicemia de jejum, lipidograma, T_4, Hormônio estimulante da tireóide (TSH), uréia, creatinina, Aspartato aminotransferase (AST), Alanina aminotransferase (ALT), velocidade de hemossedimentação (VHS) e pesquisa de antiestreptolisina O (ASLO).

3.2 Características do grupo controle

O grupo controle foi constituído por 120 indivíduos com idade entre 30 a 65 anos, de ambos os sexos, que não apresentavam história ou evidencia de doença cardiovascular atual. A doença arterial coronária foi afastada pela realização de um teste ergométrico cujo resultado foi totalmente dentro da normalidade. O grupo controle foi formado por funcionários do departamento de manutenção e trabalhadores que prestam serviço ao IDPC, e doadores de sangue ou acompanhantes do IDPC e da ISCMSP.

3.3 Aspectos Éticos

O projeto foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa do IDPC, da ISCMSP e da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP), (CEP-USP número 371).

Os indivíduos dos grupos IAM e controle foram informados de maneira clara sobre os objetivos e importância da pesquisa desenvolvida neste trabalho. Os que concordaram em participar, no dia da primeira entrevista, assinaram o Termo de

Consentimento Livre e Esclarecido, conforme determina a resolução número 196, de 13 de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde.

3.4 Amostras biológicas

A coleta de sangue periférico foi realizada por punção da veia antecubital utilizando o sistema de coleta a vácuo, sendo tres tubos de 3mL com anticoagulante EDTA (1 mg/ml) para extração de DNA (detecção de polimorfismos e agentes infecciosos) e de RNAm (análise da expressão gênica), dois tubos de 5 mL, sem anticoagulante, para algumas determinações bioquímicas e imunoquímicas, um tubo com citrato de 3mL para dosagem do fibrinogênio plasmático e um tubo com fluoreto de 3mL para determinação da concentração de glicose.

4. Métodos

4.1 Coleta de dados clínicos

As informações clinicas e de risco cardiovascular foram obtidas por meio de anamnese clássica, seguida pela realização de exame físico completo e eletrocardiograma no dia da consulta. A pressão arterial foi medida no braço direito, com o paciente sentado e tranqüilo, em três vezes consecutivas, com intervalos de 5 minutos. O peso foi determinado com roupas leves, sem sapatos, utilizando balança mecânica Filizola modelo 31 e a altura mensurada com um antropômetro de 1,92 m. O índice de massa corpórea (IMC) foi calculado com base na fórmula: peso dividido pelo quadrado da altura. (ENGELAND et al., 2003).

4.2 Avaliaçao de fatores de risco cardiovascular

Foram avaliados os seguintes fatores de risco para doença arterial coronária: diabetes, hipertensão arterial, tabagismo, dislipidemias e obesidade. Os valores para estabelecimento desses fatores de risco foram:

Hipertensão arterial sistêmica - De acordo com os dados das VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial (Brandao et al., 2010) foram considerados hipertensos os pacientes em uso de medicação anti-hipertensiva ou que apresentavam história de pressão arterial sistólica ≥140 mmHg e/ou pressão arterial diastólica ≥ 90 mmHg, utilizando-se como referência a média de avaliações em pelo menos três dias diferentes.

Diabetes Melito tipo II – De acordo com os dados das VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial (Brandao et al., 2010). Duas medidas de glicose plasmática de jejum ≥ 7,0mmol/l (126 mg/dl) em dois dias distintos, ou portadores de sintomas clássicos de diabetes associados à glicemia ≥ 11,1 mmol/l (200 mg/dl), ou pacientes recebendo terapia com insulina ou hipoglicemiante oral.

Dislipidemias - De acordo com as IV Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia sobre Dislipidemias (Sposito et al., 2007), os seguintes valores foram adotados: a) Hipercolesterolemia: colesterol total > 5,7 mmol/l (240 mg/dl), b) LDL colesterol elevado: > 4,1 mmol/l (160 mg/dl), c) HDL colesterol baixo: < 1,02 mmol/l (40 mg/dl), d) Hipertrigliceridemia: triglicérides > 2,26 mmol/l (150 mg/dl).

História familiar para doença coronária precoce - Pacientes com relato de doença coronária em pais ou irmãos, abaixo dos 55 anos em homens, ou de 65 anos em mulheres.

Tabagismo - Fumantes ativos ou com abstinência de tabaco há menos de três anos antes do IAM foram considerados tabagistas, pois trabalhos populacionais envolvendo mais de 1000 pacientes constataram que três anos após cessar o tabagismo o risco para infarto ou óbito era similar aos do que nunca fumaram (Conti et al., 2002). Pacientes que nunca fumaram ou fumaram por um período inferior a um mês foram definidos como não tabagistas. Os pacientes foram considerados tabagistas se fumassem pelo menos 5 cigarros/dia.

Obesidade – De acordo com as IV Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia sobre Dislipidemias (Sposito et al., 2007). O IMC foi utilizado para definir sobrepeso (IMC > 25,0 Kg/m^2) e obesidade (IMC > 30,0 Kg/m^2).

4.3 Perfis bioquímicos e hematológicos

A glicose, o colesterol (CHOD-PAP), os triglicérides (GPO-PAP), o HDL-colesterol (HDL-CPLUS) e a uréia foram determinados por método enzimático e a creatinina por método cinético colorimétrico em analisador automatico Hitachi-modelo 912 (Roche Diagnostics do Brasil, São Paulo, Brasil). As concentrações séricas de colesterol da VLDL (VLDL-c) e da LDL (LDL-c) foram calculadas segundo a fórmula de Friedewald e colaboradores (FRIEDEWALD; LEVY; FREDRICKSON, 1972). A fórmula só foi aplicável quando o valor de triglicérides fosse menor que 400 mg/dl. Nos casos de triglicérides acima de 400 mg/dl, o LDL-c foi obtido pelo método do anti-soro policlonal enzimatico. As dosagens de apolipoproteina AI (apo AI) e B (apo B) foram realizadas por métodos imunoturbidimétricos em sistema automatizado Hitachi-modelo 912 (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, EUA). As concentrações de T4, TSH e IL6 foram determinadas pelo método de quimioluminescência utilizando o aparelho centaur (Siemens Healthcare diagnostics, Atlanta, USA). As concentrações de PCR ultra sensível (PCRUS) sérica foram determinadas pelo método de nefelometria utilizando o nefelômetro BNII (Siemens Healthcare diagnostics, Atlanta, USA).

A contagem global de leucócitos, hemácias e plaquetas, dosagem de hemoglobina, cálculo do hematócrito, índices hematimétricos, percentual de linfócitos e valor absoluto de linfócitos foram realizadas utilizando sistema automatizado Counter modelo T.890 (Roche Diagnostics do Brasil, Sao Paulo, Brazil). A contagem diferencial de leucócitos foi realizada por método manual, através da leitura de esfregaços

sanguíneos corados pelo método de Romanowsky, com corantes May-Grunwald e Giemsa.

O plasma citratado foi mantido a -20°C para posterior determinação da concentração de fibrinogênio plasmático. As determinações do fibrinogênio foram realizadas por método de fotometria, protocolado para o aparelho Electra-modelo 1400C (Beckman coulter Inc, Palo alto, CA, USA).

4.4 Extração e análise de DNA genômico

O conjunto de reagentes da *QIAamp DNA Mini Kit* (QIAGEN, GmbH, Alemanha) foi utilizado para a extração de DNA humano e de bactérias presentes em amostra de 200 µL de sangue periférico. A quantificação de DNA foi realizada por espectrofotometria a 260nm utilizando-se o aparelho Nanodrop D-1000 (Nanodrop Technologies, Delaware, EUA) e a pureza do DNA determinada pela relação A_{260nm}/A_{280nm} (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

4.5 Pesquisa do *rDNA 16S* do agente infeccioso

4.5.1 Cepas de bactérias

A cepa de *M. pneumoniae* foi cedida pelo Laboratório sob responsabilidade do Prof. Associado Jorge Tymenetsky do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. A cepa de *C. pneumoniae AR-39* foi adquirida do American Type Culture *Collection,* (Manassas, VA, EUA).

4.5.2 Amplificação do fragmento *rDNA 16S* das bactérias

Amostras de cultura das bacterias foram submetidas à extração de DNA que foi utilizado como controle positivo para a pesquisa de agentes infecciosos pela reação em cadeia pela polimerase (PCR) e para construção do controle interno. Foram utilizados iniciadores, cuja sequencia se encontra na tabela 2, que reconhecem a regiao rDNA 16S das bacterias.

Na PCR foi utilizada 50ng de DNA, 200 nmol/L de cada iniciadores (Prodimol Biotecnologia, Bello Horizonte, MG, Brasil), 200nmol/L de dNTPs (Amersham Biosciences, Piscataway/NJ, EUA), DNA polimerase 1 U (Biotools, Madri, Espanha), tampão da PCR (75 mM Tris-HCl (pH 9,0), 50mM de KCl, 20 mM $(NH_4)_2SO_4$, 2 mmol/L de $MgCl_2$), em um volume total de 25 µL com água deionizada esterilizada.

A PCR foi realizada no termociclador Mastercycler® Gradient (Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha), utilizando o seguinte programa: ciclo inicial a 96°C por 3 min; 35 ciclos de 94°C por 1 min, 60°C por 1 min e 72°C 1 min; ciclo final de 72°C por 10 min.

Os produtos da PCR (amplicons) foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% em tampao TBE 1X (Sambrook e Russel, 2001). Foram aplicados 5 µL de amplicons diluídos em tampão de amostra de DNA. Como referência foi utilizado um marcador de tamanho molecular de DNA de 100 bp (Invitrogen, Corporation CA, EUA) . A eletroforese foi realizada por 30 min a 100 V e 60 mA em cuba horizontal modelo 250 (Invitrogen, MD, EUA). Os fragmentos foram visualizadas sob luz UV, após coloração do gel com brometo de etídio (0,5 mg/mL) (Sambrook e Russel, 2001) e fotodocumentadas em sistema de captura de imagem ChemiImager™ 4400 (v5.5) (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA, EUA).

Tabela 1- Iniciadores utilizados na PCR para amplificação da região rDNA 16S das bacterias

Bacterias	Iniciadores	Tamanho do amplicon
M penumoniae	5'- GACCTGCAAGGGTTCGTTATTT-3' 5'- GGCCGTTACCCCACCAA -3	68 pb
C. penumoniae	5'- GGACCTTACCTGGACTTGACATG -3' 5'- TGTGTATCTGTCCTTGCGGAAA-3'	70 pb

4.5.3 Preparação de células competentes

Uma colônia isolada de bactéria hospedeira *E. coli* cepa DH-5α foi expandida em meio líquido de Luria-Bertani (LB) sem antibiótico, incubando-se sob agitação a 37°C, até a obtenção de uma densidade óptica (DO) de 600 nm. As células foram isoladas por centrifugação de 4000 rpm durante 10 minutos à 4°C em seguida o precipitado foi homogeneizado com uma solução de cloreto de cálcio 50 mM gelado por 30 min e centrifugadas à 4000 g durante 5 min. As células foram re-suspensas em solução de cloreto de cálcio 50 mM e DMSO 5% e conservadas a -70°C até o momento da transformação.

4.5.4 Clonagem dos amplicons em vetor plasmidial

Os amplicons dos agentes infecciosos foram clonados no vetor plasmidial pGEM®-T Easy Vector (Amersham Biosciences, Piscataway/NJ, EUA) utilizando a enzima T4 DNA ligase (Invitrogen, MD, EUA) e tampao de ligacao rapida (Tris-HCl 60 mM pH 7,8, $MgCl_2$ 20 mM, ditiotreitol 20 mM, ATP 2 mM e 10% de polietilenoglicol). Foram utilizadas 50 ng de plasmídeo, 20 ng do amplicon e 1 U de DNA Ligase, em 10 µL de volume final. A mistura foi incubada por 1 hora à temperatura ambiente. O

produto de ligação foi utilizado para transformação de bacteria *E. coli* cepa DH-5α competente.

4.5.5 Transformação de células *E. coli* competentes com plasmídeo recombinante

Para a transformação, foram utilizados 100 µL de suspensão de células competentes (descrita no item 4.5.3) e 10 µL de plasmídeo recombinante. A mistura foi homogeneizada e incubada por 20 min em banho de gelo, por 50 minutos a 42°C sem agitação e, novamente, em banho de gelo por mais 2 min. Foi adicionado, então, 950 µL de meio SOC (2,0g de triptona bacteriológica, 0,5 g de extrato de levedura bacteriológica, 0,05 g de NaCl e água deionizada q.s.p 100 mL) e incubou-se a 37°C por 90 min com agitação de 150 rpm. O produto de transformação foi semeado em meio de cultura LB ágar contendo ampicilina 200 µg/mL, Isopropil Beta-D-1-Thiogalactopyranoside (IPTG) 0,1 mM e 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside (X-gal) 50 mg/mL, com incubação a 37°C por 16 h.

4.5.6 Extração do DNA plasmidial

Cada colônia isolada e carreadora de plasmídeo recombinante (pGEM-*Cp* e PGEM-*Mp*) foi incubada em 5 mL de meio LB líquido contendo ampicilina (100 µg/mL) por 16 h a 37°C com agitação de 150 rpm. A seguir, as culturas foram centrifugadas à 5.000 g durante 5 min, 4 mL do sobrenadante foram removidos e o restante foi re-suspenso e transferido para tubo 1,5 mL estéril. O conteudo do tubo foi centrifugado à 12.000 g durante 5 min o sobrenadante foi removido. O sedimento foi utilizado para

extração dos plasmídeos recombinantes utilizando o kit *GFX Micro Plasmid Prep Kit* (Amersham Biosciences, Piscataway/NJ, EUA).

Resumidamente, o sedimento foi re-suspenso em 300 µL de solução I (Tris-HCl 100 mM pH 7,5, EDTA 10 mM, Rnase I 400 µg/mL), agitado vigorosamente em agitador de tubos. A seguir, foram adicionados 300 µL de solução II (NaOH 1 M, SDS 5,3% m/v), homogeneizando-se o tubo por inversão de 10 a 15 vezes. Foram acrescentados 600 µL de solução III (solução tamponada contendo acetado de sódio 3M), invertendo-se o tubo várias vezes até a formação de um precipitado floculento. Centrifugou-se à 12.000 g durante 5 min à temperatura ambiente. Cuidadosamente, o sobrenadante foi transferido para outro tubo de 1,5 µL esterilizado. A Metade deste volume (aproximadamente 600 µL) foi transferida a uma coluna GFX, previamente colocada em um tubo coletor. Incubou-se por 1 min à temperatura ambiente e centrifugou-se à 12.000 g por 30 s à temperatura ambiente. O material coletado foi descartado e o procedimento foi repetido para o volume restante. Após a centrifugação, adicionaram-se 400 µL de tampão de lavagem (80% tampão Tris-EDTA e 20% etanol absoluto) à coluna, que foi centrifugada à 12.000 g por 1 min à temperatura ambiente. A coluna foi então colocada sobre outro tubo e a ela foram adicionados 75 µL de tampão TE pH 8,0. Incubou-se por 1 min à temperatura ambiente e centrifugou-se à 12.000 g por 1 min à temperatura ambiente. O DNA plasmidial diluido em TE foi mantido a -20°C.

O DNA plasmidial (50ng) foi digerido com endonucleases EcoRI 5U (New England Biolabs Inc., Ipswich MA) â 37 °C durante 2 horas e o produto gerado de 120pb e 119pb respectivamente para Cp e Mp foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1%, para detecção do amplicon clonado.

4.5.7 Uso do controle interno na amplificação rDNA 16S bacteriano

Os plasmídeos recombinantes foram utilizados como controle interno em ensaios da PCR em tempo real para quantificação de DNA bactérias *Mp* e *Cp* em amostras biologicas.

Cada plasmídeo recombinante (pGEM-*Cp* e PGEM-*Mp*) foi quantificado por espectrofotometria em UV. O número de cópias presente na solução foi calculado utilizando-se informação da concentração e do peso molecular conhecido de cada plasmídeo recombinante.

As soluções contendo os plasmídeos recombinantes foram diluidas em tampão TE pH 8,0. Doze diluições seriadas de concentrações conhecidas (10^3 a 10^9 copias) dos plasmídeos foram utilizadas em ensaios da PCR em tempo real para determinação do limite de quantificação. Na tabela 3, estao indicados os iniciadores e sondas utilizadas nos ensaios da PCR em tempo real. As sequencias das sondas *Mp* e *Cp* foram selecionadas com o auxílio do programa Primer Express (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) utilizando número de acesso genomico disponível no Banco de Dados (Gene Bank - www.ncbi.nlm.nih.gov).

Tabela 2- Iniciadores e sondas utilizados na da PCR em tempo real para amplificação da região rDNA 16S das bactérias

Bactérias	Iniciadores e sondas	Tamanho do amplicon
M. pneumoniae	5'- GACCTGCAAGGGTTCGTTATTT-3' 5'- GGCCGTTACCCCACCAA -3 FAM 5'- TGAGGGTGCGCCATA -3'MGBNFQ	68 pb
C. pneumoniae	5'- GGACCTTACCTGGACTTGACATG -3' 5'- TGTGTATCTGTCCTTGCGGAAA-3' FAM 5'- TTGACAACTGTAGAAATAC -3' MGBNFQ	70 pb

Nota: MGB, Minor Grooving Binding; NFQ, No fluorescence Quencher

Na figura 6, são apresentados os números de cópias do plasmideo *pGEM-Cp*, os valores de ciclo *threshold* (Ct) e de eficiência da PCR em tempo real utilizada para detecção e quantificação do DNA de *C. penumoniae*.

O limite de quantificacão das bactérias foram determinados de acordo com a menor concentração de DNA em que as triplicatas de amplificação possuía um Ct com desvio padrão menor que 0,5 e tanto para Cp quanto para Mp o valor encontrado foi de 1000 cópias/µL.

O limite de detecção que corresponde à amostra positiva, mas nem sempre quantificável foi determinado de acordo com a amplificação das triplicata, ou seja; se pelo menos duas das triplicatas amplificassem era considerada positiva. Portanto o valor encontrado destes experimentos foi o Ct de 37 para ambas as bactérias. Como se pode observar na figura 7, algumas amostras amplificaram no Ct acima de 37 e foram consideradas negativas, pois apenas uma das triplicatas se encontrava amplificada, isso nos garantiu uma segurança do resultado segundo critérios de controle de qualidade em testes moleculares.,

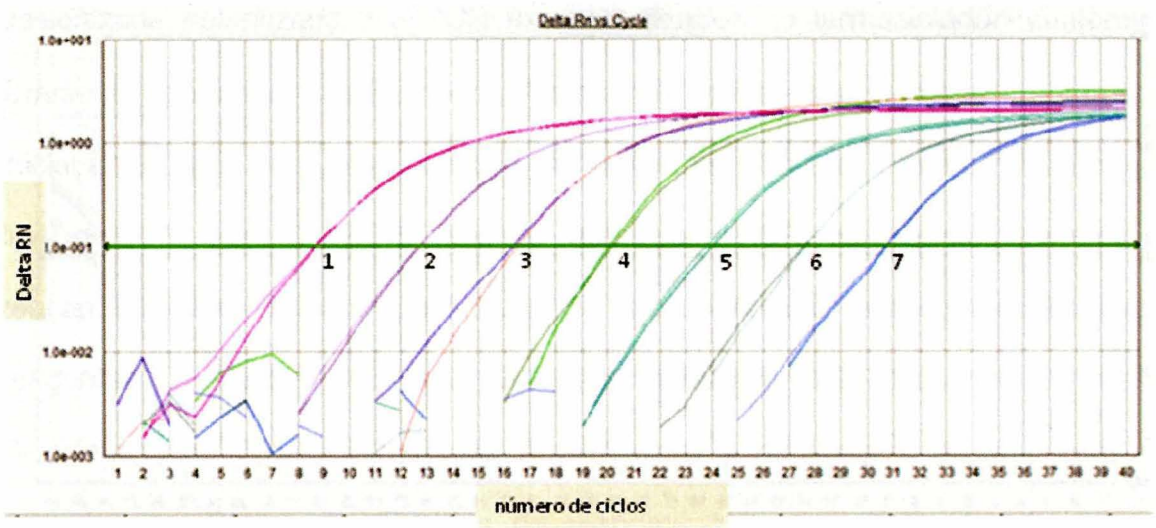

Figura 6. Amplificação de diluiçoes seriadas do plasmídeo recombinante *pGEM-Cp* (controle interno para *C. Pneumoniae*) pela PCR em tempo real: 1: 10^9 cópias; 2: 10^8 cópias; 3: 10^7 cópias; 4: 10^6 cópias; 5: 10^5 cópias; 6: 10^4 cópias; 7: 10^3 cópias.

4.5.8 PCR em tempo real para detecção de agentes infecciosos

Amostras de DNA extraído de sangue humano foram amplificadas pela PCR em tempo real juntamente com o plasmídeo recombinante (controle interno).

O ensaio da PCR em tempo real foi otimizado utilizando iniciadores 100-900 nmol/L, sonda TaqMan 50-400nM, PCR *Master Mix 1x* (Applied Biosystems, Califórnia, EUA) e 20 a 200ng de DNA, em volume final de 25 µL. Os ensaios de amplificaçao foram realizados em aparelho ABI Prism Sequence Detector System 7500 (Applied Biosystems, Califórnia, EUA), utilizando o seguinte programa: um ciclo de 95°C por 10 min; e 40 ciclos de 95°C por 10 s e 60°C por 1min. Após a otimização da reação, a seguinde condição foi utilizada nas amostras de DNA dos indivíduos deste estudo: iniciadores 200 nmol/L, sonda TaqMan 200nM, PCR *Master Mix 1x* (Applied Biosystems, Califórnia, EUA) e 100ng de DNA, em volume final de 25 µL tanto para Cp quanto para Mp (Figura 7) .

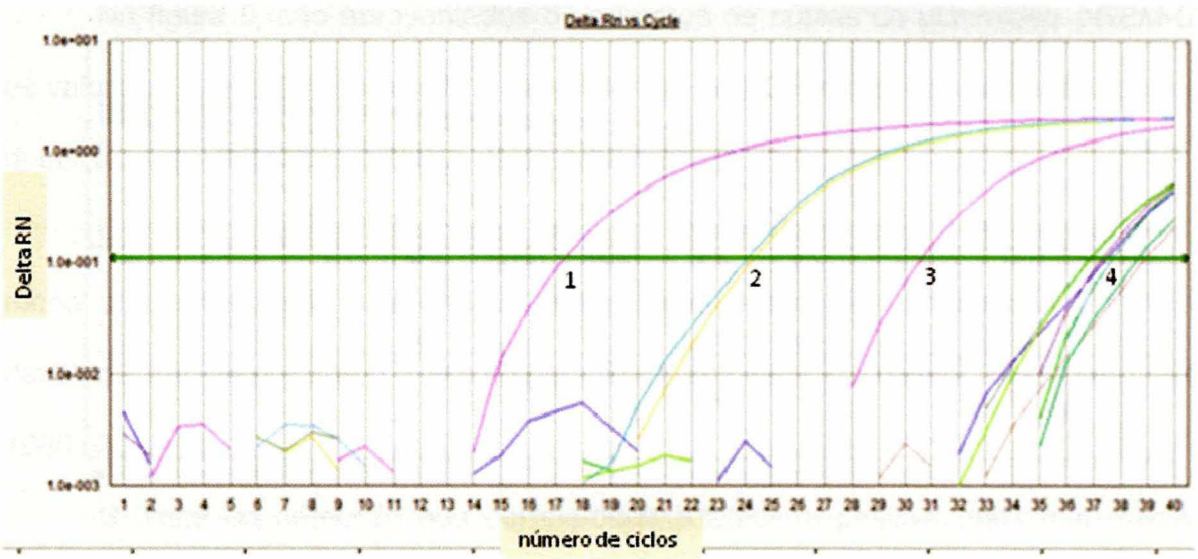

Figura 7 - Amplificação da região rDNA16S *C. penumoniae* de amostras de DNA de pacientes com IAM. 1. 10^7 cópias/uL; 2. 10^5 cópias/uL; 3. 10^3 cópias/uL (Limite de quantificação); 4. Limite de detecção.

4.5.9 Sequenciamento de DNA

Com a finalidade de validação da PCR em tempo real para detecção e quantificação de DNA de *C. pneumoniae* e *M. pneumoniae*, amostras de DNA de seis indivíduos com resultados positivos pela PCR em tempo real foram sequenciadas.

Realizou-se na PCR com os seguintes oligonucleotídos sintetizados de acordo com a sequencia do vetor plasmidial *pGEM®-T Easy Vector* (Amersham Biosciences, Piscataway/NJ, EUA) (Tabela 3) e teve as seguintes condições: 50ng de DNA, iniciadores 200 nmol/L (Prodimol Biotecnologia, Bello Horizonte, MG, Brasil), dNTPs 200nmol/L (Amersham Biosciences, Piscataway/NJ, EUA), DNA polimerase 1 U (Biotools, Madri, Espanha), tampão da PCR (75 mM Tris-HCl (pH 9,0), 50mM de KCl, 20 mM $(NH_4)_2SO_4$, 2 mmol/L de $MgCl_2$), em um volume total de 25 µL com água

desionizada esterilizada. Na PCR foram realizados no termociclador Mastercycler® Gradient (Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha), utilizando o seguinte programa: ciclo inicial a 96°C por 3 min; 35 ciclos de 94°C por 1 min, 60°C por 1 min e 72°C 1 min; ciclo final de 72°C por 10 min. Depois de realizada a PCR, os produtos gerados desta reação (amplicons) foram purificados de acordo com o protocolo do conjunto de reagentes *GFX PCR DNA and Gel Band purification* (GE Healthcare, Amersham Biosciences do Brasil, São Paulo, Brasil). Após a purificação, os amplicons foram enviados ao Centro de Estudos do Genoma Humanos já misturados com seu respectivo oligonucleotídeo a ser usado na reação de sequenciamento. Para cada reação de sequenciamento que foi realizada foi enviado 5,0uL de produto da PCR (20ng/µL) acrescidos de 2,5uL de oligonucleotídeos (5µM).

Na PCR, foram utilizados 100ng de DNA, iniciador 5µM (Prodimol Biotecnologia, Bello Horizonte, MG, Brasil), dNTPs 200nmol/L (Amersham Biosciences, Piscataway/NJ, EUA), 2µL de BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), 1µL do tampão BigDye® Terminator v3.1 5x Sequencing (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) em um volume total de 10µL com água desionizada esterilizada.

A PCR foi realizada no ABI 3730 DNA Analyser (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), utilizando o seguinte programa: ciclo inicial a 96°C por 1 min; 25 ciclos de 96°C por 1seg, 50°C por 5seg e 60°C por 4seg.

O Resultado do sequenciamento da regiao rDNA 16S de *C. pneumoniae* de uma amostra de paciente com IAM é apresentados na Figura 7.

A sequencia de nucleotídeos da região rDNA16S de *C. pneumoniae* identificada após o seqüenciamento foi comparada com a sequencia disponível no banco de dados do NCBI (www.nbi.nlm.nih.gov). Essa comparação revelou uma semelhança de 100% entre a sequencia obtida e a referencia, confirmando a presença de DNA bacteriano na amostra de paciente. O resultado obtido no sequenciamento da região rDNA16 do *M. Pneumoniae* tambem foi confirmado (dado não mostrado).

Tabela 3- Iniciadores utilizados na PCR para amplificação do plasmídeo recombinante (pGEM-*Cp* e PGEM-*Mp*)

DNA	Iniciadores e sondas	**Tamanho do amplicon**
pGEM-*Cp* e PGEM-*Mp*	5' -GTTTTCCCAGTCACGACGT-3' 5'-AGCTTGGCGTAATCATG -3	275 e 273 pb

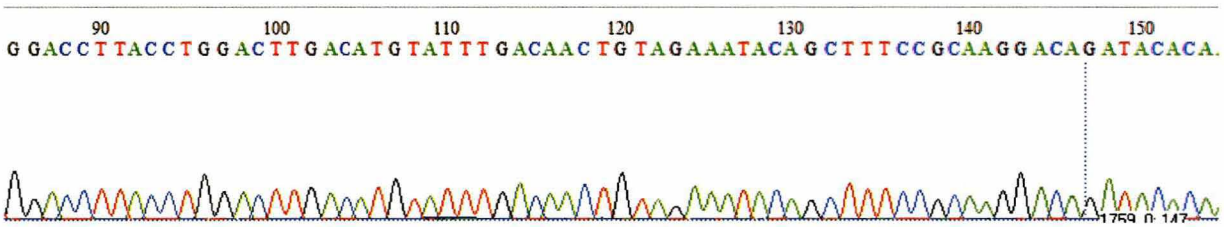

Figura 8 - Eletroferograma do sequenciamento da região rDNA16S de *C. pneumoniae* presente de uma amostra de paciente com IAM.

4.6 Extração e análise de RNA total de leucócitos de sangue periferico

Imediatamente após a coleta do sangue periférico, o RNA total foi purificado das células através da utilização de um conjunto de reagentes *da QIAamp RNA blood Mini Kit* (QIAGEN, GmbH, Alemanha) de acordo com o manual de instrução do fabricante. Posteriormente a extração, a concentração de RNA total foi obtida por

espectrofotometria no ultravioleta (UV) utilizando-se o aparelho Nanodrop D-1000 (Nanodrop Technologies, Delaware, EUA) e o grau de pureza do RNA determinado pela relação A_{260}/A_{280} (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

A síntese de cDNA a partir de 200µg de RNA total foi realizada utilizando o kit de reagentes SuperScript™ II reverse transcriptase (Invitrogen, Gathersburg, EUA) de acordo com o manual de instrução do fabricante. O cDNA obtido deste ensaio foi utilizado para quantificação relativa dos genes *TLR2, TLR4, IL6* e *TNFA*.

4.7 Análise da expressão de RNAm pela PCR em tempo real

A quantificação relativa da expressão de *TLR2, TLR4, IL6* e *TNFA* foi realizada pela PCR em tempo real (qPCR) utilizando o sistema de sondas de detecçao TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). O gene gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (*GAPD*) foi utilizado como controle endogeno.

A primeira etapa consistiu da síntese de cDNA, utilizando200 ng de RNAm, iniciadores aleatorios 200 nM (*random primers*) (Invitrogen, MD, EUA), dNTP 200nM (Amershan-Pharmacia Biotech do Brasil, Brasil), DTT 20mM, transcriptase reversa 200 U (Superscript™ II RT RNase H) e tampão (Tris-HCL 250mM pH 8,3, KCl 375mM, $MgCl_2$ 15mM) (Invitrogen, MD, EUA). A mistura foi incubada a 25 °C por 10 min, seguida de 50 °C por 50 min e 70 °C por 15 min. O cDNA obtido e conservado a -20 °C até a realização da PCR.

Na segunda etapa, o cDNA de cada gene foi amplificado pela qPCR utilizando-se iniciadores 900 nM e sondas marcadas com FAM 250nM (Applied

Biosystems, Foster City, CA, EUA). Os demais reagentes da qPCR foram adquiridos em solução *Master Mix* [$MgCl_2$ 25nM, dNTPs 10mM, Uracil N-glicosilase (UNG, AmpEraseR) 30 U, enzima Amplitaq Gold 150 U e tampão de reação] (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Para uso, essa solução foi diluída 2 vezes. Foi utilizado volume final de 25 µL por reação e os ensaios foram realizados em duplicata.

Os oligonucleotídeos e sondas utilizados na qPCR (Tabela 5) foram selecionados utilizando-se os programas *Primer Express® 3.0* (Applied Biosystems, Califórnia, EUA) e *Primer Premier 5.0* (Premier Biosoft International, Califórnia, EUA). As regiões analisadas possuem seqüência disponíveis: *TLR2* (NM_003264), *TLR4* (NM_ 138554.2), *IL6* (NM_000600), *TNFA* (NM_0001145645) e *GAPD* (NM_002046.3) no Banco de genes (*GenBank*) do *National Institute of Health* (NIH) (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Tabela 4. Iniciadores e sondas utilizados na PCR em tempo real para quantificação da expressão de RNAm

Genes	Iniciadores e sondas	Tamanho do amplicon
TLR2	5'- ATACAGACAAAGGCATACA-3'	103 pb
	5'-ACCATAAACCCAACAACT-3'	
	FAM 5'-TTTATCGTCTTCCTGGTTCAAGCCCCTTTC -3' TAMRA	
TLR4	5'-TGCGTGAGACCAGAAAGC-3'	123 pb
	5'-GTCCAGGTTCTTGGTTGA-3'	
	FAM 5'-ATGTCTGCCTCGCGCCTGGC -3' TAMRA	
IL6	5'- GATTGTGCAATGTGACGTCCTT-3	125 pb
	5'- GCTGCACTTTTCCCCCTAGTT-3	
	FAM 5'-CGCCTCCAGGAGCCCAGCTATGA -3' TAMRA	
TNFA	5'- GTAGGACCCTGGAGGCTGAAC-3	80 pb
	5'- CCCAAAAGAAATGGAGGCAAT-3	
	FAM 5'-CCCCCTCCTTCAGACACCCTCAACC--3' TAMRA	
GAPD	5'-GGAAGGTGAAGGTCGGAGTCA-3	130 pb
	5'-CTGGAAGATGGTGATGGGATTTC-3'	
	FAM 5' CATGGCACCGTCAAGGCTGAGAACG 3' TAMRA	

Os amplicons foram gerados no equipamento ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), utilizando-se o seguinte programa: 1 ciclo a 50°C por 2 min (ativação de UNG); 1 ciclo a 95°C por 10 min (inativação da UNG); 40 ciclos de 15 s a 95°C e 1 min a 60°C. Os sinais de fluorescência emitidos pelos fluoróforos das sondas TaqMan foram detectadas pelo equipamento e os dados foram analisados utilizando o programa 7500 System SDS Software (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) que geram curvas semi-logarítmicas dos sinais de amplificação. Esse programa fornece o

parâmetro ciclo em que o sinal de fluorescência é significativo, denominado *threshold* (Ct) (BUSTIN; MUELLER, 2005; KUBISTA 2006). Para cada amostra de cDNA, o Ct de cada gene é comparado com o do *GAPD* (controle endógeno).

A quantidade de cDNA utilizada nos ensaios foi otimizada a partir de uma curva-padrão, realizada com diferentes concentrações de amostra. A curva-padrão permite avaliar a linearidade da amplificação bem como a eficiência da mesma. Para esta finalidade, foram utilizadas diluições seriadas (1:2, 1:4, 1:8 e 1:16) de cada cDNA de amostras usadas apenas para testes nos ensaios da qPCR. As diluições de cDNA e os respectivos valores de Ct foram plotados em gráficos que permitem verificar a relação entre duas variáveis (Ct *vs* log da diluição de cDNA). Segundo Livak e Schmittgen (2001), a alta eficiência de ensaios da qPCR deve estar entre 90% e 110%, a inclinação (do inglês *slope*) da curva-padrão deve ser próximo de -3,3. Quando esses critérios não são atendidos, é preciso verificar as concentrações de iniciadores e sondas em outras curvas-padrão.

As eficiências das amplificações foram analisadas utilizando como parâmetro o Ct (BUSTIN, 2000). A análise da expressão de RNAm dos genes foi realizada com base na fórmula: $2^{-\Delta Ct}$, na qual ΔCt corresponde à diferença entre a média Ct da amostra em estudo e a média Ct do controle endógeno GAPD.

Tabela 5 – Valores de inclinação da curva e eficiência dos ensaios da qPCR para analise da expressao de RNAm

Gene	Inclinacao da curva	Eficiencia
TLR2	-3.46	95%
TLR4	-3.38	98%
IL6	3.3	100%
TNFA	-3.53	91%
GAPD	3.3	100%

4.8 Análise de polimorfismos genéticos pela PCR em tempo real

Os polimorfismos *TLR2* Arg753Gln (G+2258G>A), *TLR4* [Asp299Gli (A+896G) e Thr399Ile (C+1197T)], *CD14* -260C>T e *TNFA -308G>A* foram detectados pela PCR em tempo real (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) utilizando-se o programa *High Resolution Melting* (HRM). Esse programa caracteriza o genótipo pela identificação gráfica (fluorescência *versus* temperatura) da dissociação do produto da PCR (Figura 9-13).

As condições da PCR-HRM foram: iniciadores 200 nM (Prodimol Biotecnologia, Bello Horizonte, MG, Brasil), Amplitaq Gold PCR *Master Mix* ($MgCl_2$ 25nM, dNTPs 10mM, AmpEraseR UNG 30U, enzima Amplitaq Gold 150 U e tampão de reação) (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), e fluoroforo intercalante SYTO® 9 green 1,5 µM (Invitrogen, Gathersburg, EUA), em ensaios de 25 µL de volume final.

Os oligonucleotídeos utilizados na PCR-HRM (Tabela 6) foram selecionados

utilizando-se os programas *Primer Express® 3.0* (Applied Biosystems, Califórnia, EUA) e *Primer Premier 5.0* (Premier Biosoft International, Califórnia, EUA). As regiões analisadas possuem sequencias disponíveis, *CD14* (-260C>T, rs2569190), *TLR4* (Asp299Gli, rs4986790, Thr399Ile, rs4987233), *TLR2* (Arg753Gln, rs5743709) e *TNFA* (-308G>A, rs3093544) no banco de genes (*GenBank*) do *National Institute of Health* (NIH) (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Tabela 06 - Iniciadores utilizados nos ensaios da PCR em tempo real para detecção de polimorfismos genéticos

Polimorfismo	Iniciadores	Tamanho do Produto da PCR
TLR4 Asp299Gli	S 5' CCATTGAAGAATTCCGATTAGCA 3'	98 bp
	AS 5' ATGTTTCTTCATTTTCCCTGGTG 3'	
TLR4 Thr399Ile (C1197T)	S 5' AAAGGTTGCTGTTCTCAAAGTGATT 3'	104 bp
	AS 5´ TGAGTTCAAACTTCTTGGGCTTAGA 3'	
TLR2 Arg753Gln (G2258A)	S 5' CCATTCCCCAGCGCTTCT 3'	58 bp
	AS 5' TGAACACCAAGACCTACCTGGA 3'	
CD14 - 260C>T	S 5' TTTCCTGGAAATATTGCAAT 3'	78 pb
	AS 5' TCTGCAGGGCATCTAGGGT 3'	
TNFA - 308G>A	S 5' AGGCAATAGGTTTTGAGGG 3'	84 pb
	AS 5' TCCTCCCTGCTCCGATTCCG 3'	

O programa da PCR-HRM utilizado para gerar os amplicons foi: 1 ciclo a 95°C por 10 min, 40 ciclos de 15 s a 95°C e 1 min a 60°C. Os sinais de fluorescência emitidos pelo fluoroforo SYTO® 9 foram detectados pelo equipamento ABI Prism 7500 Fast (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

Após a amplificação, foi realizada a curva de dissociação constituída por duas etapas, sendo a primeira fase a de declínio de temperatura de 95°C a 50 °C para ressociação do amplicon e posteriomente se eleva a temperatura de 50°C a, 95°C, sendo que nesta fase haverá a captura de fluerescência.

Amostras de DNA com genotipo conhecido (referencia), em heterozigose para as polimorfismos *TLR2* e *TLR4*, foram gentilmente cedidas pela Dr. Helga-Paula Török do Department of Internal Medicine II, Campus Grosshadern University of Munich (Munich, Alemanha). Para os demais polimorfismos, foi realizado o sequenciamento de DNA de 6 amostras, sendo 2 de cada perfil de genótipo. Nas figuras 9 a 13 estao apresentados os perfis da PCR-HRM para cada polimorfismo estudado.

Tabela 07. Iniciadores utilizados na PCR para sequenciamento dos amplicons

Genes	Iniciadores e sondas	Tamanho do amplicon
TNFA	5'-CTCTCCCTCAAGGACTCAGC-3 5'-CAGTTGTTGGCACACCCAG-3	452 pb
CD14	5'-TGGGGAGAGAGCAGAGGTCTA-3 5'-CCCAATCCCCCTACCTTATATC-3'	557 pb

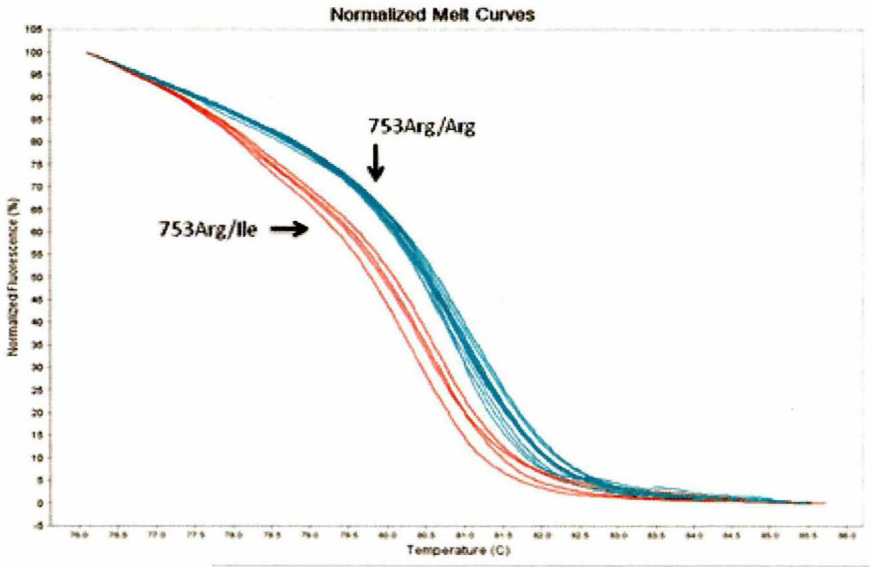

Figura 9. Curvas de dissociação da PCR-HRM do polimorfismo *TLR2* Arg753Gln (G+2258A).

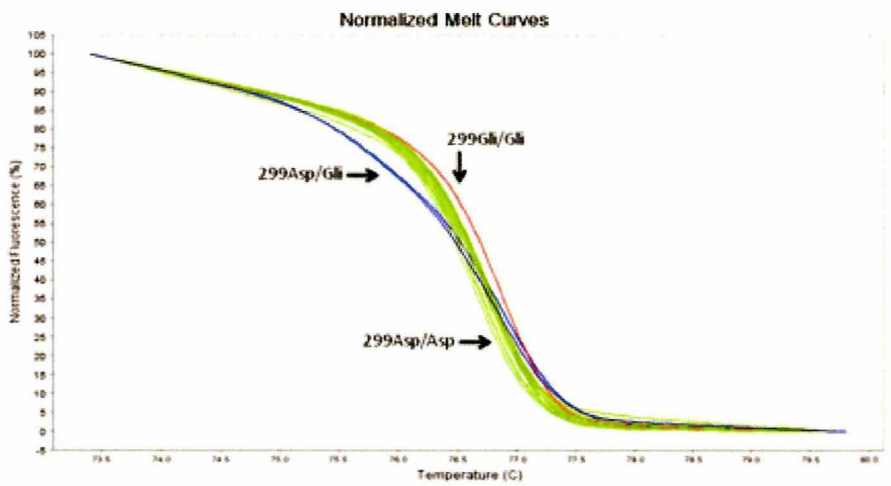

Figura 10. Curvas de dissociação da PCR-HRM do polimorfismo *TLR4* Asp299Gli (A+896G).

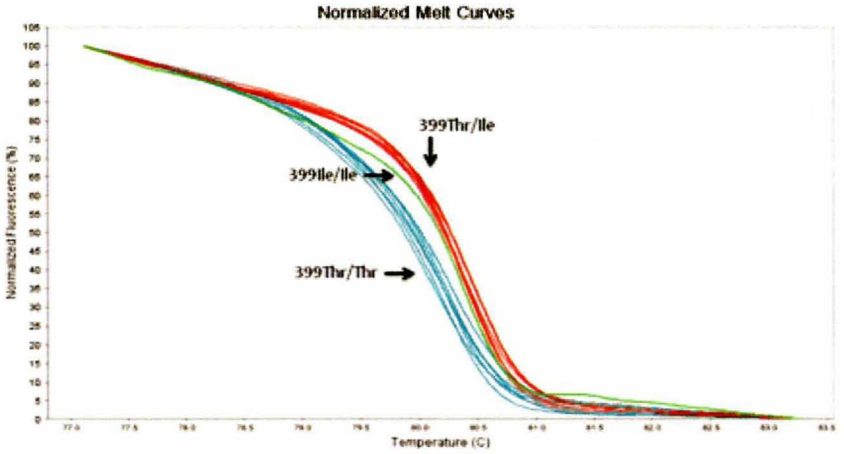

Figura 11. Curvas de dissociação da PCR-HRM do polimorfismo *TLR4* Thr399Ile (C+1197T).

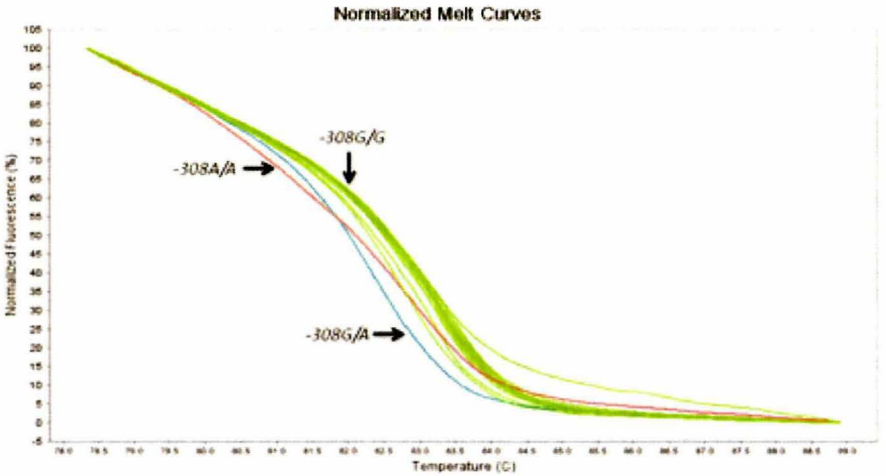

Figura 12. Curvas de dissociação da PCR-HRM do polimorfismo TNFA -308G>A.

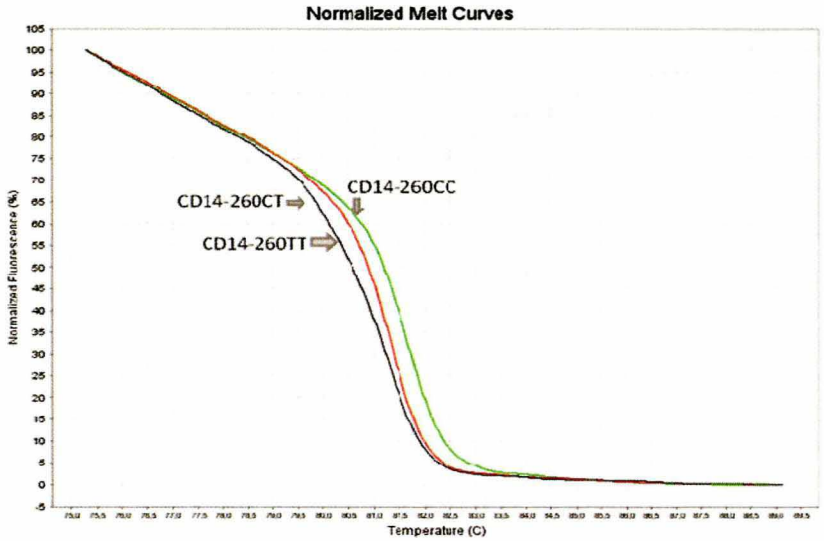

Figura 13. Curvas de dissociação da PCR-HRM do polimorfismo *CD14* -260C>T.

4.9 Pesquisa de anticorpos anti-*C. pneumoniae*

Amostras de soro foram foram diluídas em tampão fosfato (PBS) 0,1M, pH 7,2 e utilizadas para a pesquisa de IgG e IgM anti-*C. pneumoniae*. Os anticorpos foram detectados por imunofluorescência indireta, utilizando-se como antígeno células de *C. Pneumoniae*. Em cada duas lâminas contendo o antigeno, foi depositada uma gota de soro diluído de 1:16 a 1:512. As lâminas foram incubadas por 30 min a 37°C em câmara úmida. A seguir, foram adicionados a cada lâmina os anticorpos anti-IgG e anti-IgM humanos conjugados à fluoresceína (Uniscience do Brasil, SP).

Foram consideradas positivas as reações cuja intensidade de fluorescência das inclusões foi maior ou igual a duas cruzes (++) numa escala de 0 a 4 cruzes (Magder et al., 1990). Em cada ensaio foram incluidas amostras-controle positiva e negativa para *C. Pneumoniae*.

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram analisados utilizando os programas SigmaStat v.2.0 (SPSS Inc., Chicago, EUA) e SPSS 15 (SPSS Inc., Chicago, EUA).

Para determinação do tipo de simetria das variáveis quantitativas contínuas foi realizado o teste de simetria de Kolmogorov-Smirnov. Para as variáveis com distribuição assimétrica foram utilizados testes não paramétricos, o teste U de Wilcoxon-Mann-Whitney para comparar as tendências centrais de duas amostras e o teste de Kruskal-Wallis para comparar mais de duas populações quanto a tendência central dos dados. Para as variáveis com distribuição simétrica foram utilizados testes paramétricos. Estes testes foram utilizados para comparar os valores de parâmetros bioquímicos entre os grupos estudados e avaliar o efeito dos polimorfismos genéticos sobre os testes parâmetros (teste U de Wilcoxon-Mann-Whitney e test t de Student). No caso de comparação entre três grupos haplótipos utilizaram-se os testes *One Way* ANOVA (variáveis simétricas) e teste de Kruskal-Wallis (variáveis assimétricas). Para comparação múltipla após as análises de variância foram utilizados o teste de Tukey (paramétrico) ou o teste de Dunn (Não paramétrico). Variáveis categóricas foram comparadas por χ^2 (Qui-Quadrado) ou Teste Exato de Fisher.

Para as análises, os indivíduos afro-brasileiros foram agrupados com os indivíduos pardos a fim de aumentar o poder estatístico dos testes. O nível de significância estabelecido foi de $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 Casuística

Participaram do estudo duzentos e vinte indivíduos, sendo 100 pacientes com infarto do miocárdio (IAM) formando o grupo de estudo e 120 indivíduos controles (GC). A idade dos indivíduos variou entre 30 e 65 anos, média 60,6 ± 10,6 anos (IAM) e média 55,1±8,7 anos (GC).

No grupo IAM, 65 pacientes (65%) eram do gênero masculino e no grupo controle 90 indivíduos (75%) eram do mesmo gênero e não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos, p=0,137. Em relação à cor da pele, 65 pacientes (65,0%) do grupo IAM eram brancos e 79 indivíduos (65,9%) do grupo controle tinham a mesma cor da pele, p=1,000.

Os pacientes do grupo IAM, em geral, apresentaram fatores de risco clássicos (Diabetes, IMC elevado, hábito de fumar, hipertensão) para o desenvolvimento de doença aterosclerótica. Em relação ao IMC, houve, em média, indivíduos com valores maiores no grupo IAM em relação ao grupo controle, p<0,0001. Da mesma forma, houve uma maior frequencia de hipertensos (62%), fumantes (75%), diabéticos (20%) no grupo IAM do que no grupo controle tabela 7. Por outro lado, Não foi significante a frequencia de indivíduos que consumiam bebidas alcoólicas entre os grupos, 30 % IAM e 23 % GC, p=0,683.

Tabela 8 – Dados biodemográficos dos indivíduos de acordo com os grupos estudados.

	Grupos		
	IAM	GC	*P*
Idade (anos)	60.6±10,6	55,1±8,7	< 0,0001*
Gênero (Masc) (%)	65 (65,0)	90 (75,0)	=0,137**
IMC (Kg/m²)	28,6±3,5	24,0±3,4	< 0,0001*
cor da pele (Branco) (%)	65 (65,0)	79 (65,9)	=1,000**
Hipertenso (%)	62 (62,0)	24 (20,0)	< 0,0001**
Hábito de fumar (%)	75 (75,0)	40 (33,3)	< 0,0001**
Diabetes (%)	20 (20,0)	6 (5,0)	< 0,0001**
Consumo de bebida alcoólica (%)	30 (30,0)	28 (23,3)	= 0,683**

Nota: Valores quantitativos são apresentados como media ± DP dos dados e os valores qualitativos são apresentados como número de indivíduos e entre parênteses a frequencia absoluta. Teste-*t* de Student*. Teste de distribuição qui-quadrado**. IMC=Índice de massa corpórea, IAM=infarto agudo do miocárdio, GC=controle.

6.2 Parâmetros Bioquímicos

O perfil inflamatório determinado neste estudo mostra que as concentrações de Interleucina-6, Proteína C reativa e fibrinogênio tiveram diferença significante entre os grupos, sendo que os pacientes do grupo IAM apresentaram maior concentração em relação ao grupo Controle, p<0,0001. O mesmo foi evidenciado em relação à quantidade de leucócitos (p<0,0001). Por outro lado, em relação ao número de plaquetas não houve diferença significativa entre os dois grupos estudados (Tabela 8).

O perfil lipídico dos pacientes do grupo IAM apresentaram concentrações plasmáticas de triglicérides e VLDL-c maiores que as dos indivíduos do GC, p<0,001. As concentrações plasmáticas de LDL-c e Apo B não foram significativamente

diferentes entre os dois grupos estudados (p=0,937 e p=0,683, respectivamente). As concentrações plasmáticas de HDL-c e Apo A1 foram menores no grupo IAM em relação ao grupo Controle (p<0,001).

Os pacientes do grupo IAM apresentaram maiores valores de glicemia de jejum em relação ao grupo controle (p<0,0001, Tabela 8).

Tabela 9 – Dados bioquímicos e hematológicos dos grupos de pacientes com infarto agudo do miocárdio (IAM) e indivíduos controles (GC).

	Grupos		
	IAM	GC	*P*
IL-6 (pg/mL)	21,11 ± 40,06	0,94±1,2	< 0,0001**
PCRus (mg/dL)	3,97 ± 9,97	0,48±1,62	< 0,0001**
Fibrinogênio (mg/dL)	474,8 ± 195,5	273,75±72,7	< 0,0001**
Leucócitos (10^3/mL)	8,052 ± 2,616	6,283±1,152	< 0,0001**
Plaquetas (10^3/µL)	222,3 ± 68,7	232,61±55,11	= 0.104**
Colesterol total (mmol/l)	4.74 ± 1.39	4.48 ± 1.09	= 0,984**
HDLc (mmol/l)	1.07 ± 0.25	1.42 ± 0.37	< 0,0001*
LDL c (mmol/l)	2.82 ± 1.12	2.85 ± 0.95	= 0,937**
VLDL c (mmol/l)	0.76 ± 0.40	0.52 ± 0.32	< 0,0001**
Triglicérides (mmol/l)	2.11 ± 1.99	1.12 ± 0.59	< 0,0001**
Glicemia (mmol/l)	6.64 ± 3.19	5.15 ± 0.57	< 0,0001*
ApoA1 (g/l)	1.33 ± 0.26	1.45 ± 0.25	< 0,0001*
ApoB (g/l)	0.99 ± 0.32	0.86 ± 0.22	= 0,683**

Nota: Valores são apresentados como media ± DP dos dados. Tee-*t* de Student* ou teste U de Wilcoxon-Mann-Whitney**. HDLc=Colesterol da lipoproteina de alta densidade, LDLc=colesterol da lipoproteina de baixa densidade, VLDLc=colesterol da lipoproteina de muito baixa densidade, IAM=infarto agudo do miocárdio, GC=controle, ApoB=apolipoporteina B. Apo A=apolipoproteina A.

6.3 – Positividade para agentes infecciosos e Infarto agudo do miocárdio

Avaliou-se a freqüência de positividade dos agentes infecciosos propostos pela PCR em tempo real e a detecção de anticorpos classes IgM e IgG anti-Chlamydophila pneumoniae utilizando o DNA extraído do sangue periférico e o soro, respectivamente. A porcentagem de positividade para *Chlamydophila pneumoniae*, nas amostras de sangue periférico analisadas pela PCR em tempo real no grupo IAM foi de 18% e no grupo controle de 8,1%, p=0,071 (Tabela 10). Da mesma forma, a porcentagem de positividade para *Mycoplasma pneumoniae* nas amostras de sangue periférico analisadas pela PCR em tempo real no grupo IAM não foi significante quando comparadas com a frequencia no grupo controle, 5,0% (IAM) e 11,2% (GC), p=318. Neste estudo, o gênero masculino não mostrou predisposição a ser infectado por *Chlamydophila pneumoniae* e *Mycoplasma pneumoniae* em nenhuma das condições estudadas p=0,590 (IAM) e p=1,000 (GC). Da mesma forma a cor da pele não predispõe a infecção por estas bactérias (tabela 10). Em adição, outros fatores de riscos para infarto agudo do miocárdio, tais como, Hipertensão, hábitos de fumar e diabetes não estão relacionados com infecção por *Chlamydophila pneumoniae* e *Mycoplasma pneumoniae*.

A prevalência de títulos positivos da classe de anticorpos IgG anti-*Chlamydophila pneumoniae,*na diluição 1:16 foi similar quando comparados os grupos IAM (36,4%) com controles (36,5%), p=1,000. Após a detecção da mesma classe de anticorpos na diluição 1:512, a porcentagem de positividade no grupo IAM foi 7,1% e no grupo controle de 3,8%, contudo esta diferença de percentagem não foi significativa

(p=0,719). Por outro lado, não foi detectado nenhum paciente ou controle positivo para anticorpos da classe IgM anti-*Chlamydophila pneumoniae* na diluição 1:16 (Tabela 11).

Tabela 10 – Distribuição da freqüência de positividade de *Chlamydophila pneumoniae* (Cp) e *Mycoplasma pneumoniae* (Mp) detectada pela PCR em tempo real nos grupos IAM e controle.

	Cp (%)		Mp (%)	
Condição	Sim	Não	Sim	Não
IAM	18 (18,0)	82 (82,0)	16 (16,0)	84 (84,0)
GC	10 (8,1)	110 (91,9)	13 (11,2)	107 (82,4)
	p=0,071		p=0,318	

Nota: Valores são apresentados como número de indivíduos e entre parênteses a frequencia absoluta. Teste de distribuição qui-quadrado, Cp=Chlamydoplila pneumoniae, Mp=Mycoplasma pneumoniae, IAM=infarto agudo do miocárdio, GC=controle.

Tabela 11 – Características clínicas com base na positividade de *Chlamydophila pneumoniae nos* em pacientes IAM e indivíduos controles.

Cp+	IAM (18)	GC (10)
Gênero (IAM);(C)		
Masc. (65);(90)	20,0 % (13)	8,8% (8)
Fem. (35);(30)	14,3% (5)	6.6% (2)
	p=0.590	*p*=1.000
Cor da pele		
Branco (65);(79)	21.5%(14)	8.8%(7)
Outros (35);(41)	11.4%(4)	7.3%(3)
	p=0.279	*p*=1.000
Hipertensão		
Sim (62);(24)	19.3%(12)	12.5%(3)
Não (38);(96)	15.8%(6)	7.3%(7)
	p=0.791	*p*=0.416
Hábito de fumar		
Sim (75);(40)	17.3% (13)	7.5% (3)
Não (25);(80)	20.0% (5)	8.7% (7)
	p=0.768	*p*=1.000
Diabetes		
Sim (20);(6)	20.0% (4)	0.0% (0)
Não (80);(114)	15.0% (12)	100.0% (10)
	p=0.733	*p*=1.000

Nota: Valores são apresentados como número de indivíduos e entre parênteses a frequencia absoluta. Teste de distribuição qui-quadrado, Cp=Chlamydoplila pneumoniae, Mp=Mycoplasma pneumoniae, IAM=infarto agudo do miocárdio, GC=controle.

Tabela 12 – Distribuição da frequência de positividade de *Chlamydophila pneumoniae* (CP) detectada por imunofluorêscencia indireta (IFI) nos grupos IAM e controle.

	CP IgG 1:16		CP IgG 1:512		CP IgM 1:16	
Condição	+	-	+	-	+	-
IAM	36 (36,4)	63 (63,6)	7 (7,1)	92 (92,9)	0 (0,0)	99 (100,0)
GC	44 (36,5)	76 (63,5)	5 (3,8)	115 (96,2)	0 (0,0)	120 (100,0)
	p=1,000*		p=719*		p=1,000*	

Nota: Valores são apresentados como número de indivíduos e entre parênteses a frequência absoluta. Teste de distribuição qui-quadrado, Cp=Chlamydoplila pneumoniae, Mp=Mycoplasma pneumoniae, IAM=infarto agudo do miocárdio, GC=controle.

6.4. Associação entre expressão gênica e infarto agudo do miocárdio.

Observou-se uma menor expressão do gene TLR4 (p=0,003) no grupo IAM em comparação ao grupo controle. Por outro lado, a expressão dos genes IL-6 (p=0,068), TLR2 (p=0,637) e TNF-α (0,216) não tiveram uma diferença significante quando comparado o grupo IAM com o grupo Controle, porém houve, em média, uma maior expressão no grupo IAM do que no grupo controle (Tabela 12).

Tabela 12 – Expressão de mRNA dos genes TLR4, IL6, TLR2 e TNF-α em células do sangue periférico de indivíduos que tiveram IAM e nos controles.

	Grupos		
Gene	IAM	GC	*p*
TLR4	0,00113±0,00102	0,00144±0,000118	0,003*
IL-6	0,0508±0,0314	0,0257±0,0084	0,068
TLR2	0,349±0,242	0,315±0,254	0,637
TNF-α	0,261±0,415	0,197±0,223	0,350

Nota: Valores da expressão gênica são apresentados como media ± DP dos dados de 2^-ΔCt. Teste U de Wilcoxon-Mann-Whitney foi utilizado para avaliar a associação entre os grupos. Em asterístico, os resultados estatisticamente significantes. IAM=Infarto agudo do miocárdio, GC=Controle, TLR=Toll Like Receptors, IL-6=Interleucina 6, TNF-α=Tumor Necrose factor-α.

6.5. Associação entre positividade dos agentes infecciosos, imunoglobulinas e expressão gênica

De acordo com a comparação entre as médias dos valores de expressão gênica normalizados, não se pode observar nenhuma associação entre positividade para DNA de *Cp* e expressão dos genes TLR4 (p=0,343), IL-6 (p=0,149), TLR2 (p=0.134) e TNF-α (p=0.061) no grupo IAM (Figura 13). Da mesma forma, nenhuma associação foi observada no grupo controle. Indivíduos positivos para DNA *Mp* não foi associados com diferentes valores de expressão gênica, tanto no grupo IAM (Figura 14) quanto no grupo controle. Por outro lado, pacientes positivos para títulos IgG 1:16 anti-*Chlamydophila pneumoniae* tiveram valores médios menores (0,000878±0,00098) de expressão do gene TLR4 que pacientes negativos (0,00125±0,00104), p=0,032. No entanto, nenhuma diferença significante foi observada quando valores de expressão média dos genes IL-6, TNF- α e TLR2 foram comparadas entre os grupos IAM e C (Figura 15). Da mesma forma, pacientes positivos para títulos de IgG anti-*Chlamydophila pneumoniae* detectados na diluição 1:512 tiveram valores médios menores (0,00269±0,00428) de expressão do gene IL-6 que pacientes negativos para esta classe de anticorpos (0,00551±0,00343), p=0,005. Em adição, pacientes IgG anti-*Chlamydophila pneumoniae* positivos tiveram valores médios menores (0,0463±0,0886) de expressão do gene TNF-α que pacientes negativos (0,248±0,306), p=0,014. Por

outro lado, nenhuma diferença significante foi observada quando comparados valores médios dos genes TLR2 e TLR4 (Figura 16).

Tabela 13 – Associação entre positividade para DNA de *Cp* e a expressão de mRNA dos genes TLR4, IL6, TLR2 e TNF-α em células do sangue periférico de indivíduos do grupo IAM.

Gene	Grupos		*p*
	CP+	CP-	
TLR4	0,000862±0,000209	0,00106±0,000115	0,343
IL-6	0,0164±0,00827	0,0592±0,0406	0,140
TLR2	0,230±0,0622	0,361±0,0392	0,130
TNF-α	0,136±0,0539	0,255±0,0469	0,060

Nota: Valores são apresentados como media ± DP dos dados de 2^-ΔCt. Teste U de Wilcoxon-Mann-Whitney foi utilizado para avaliar a associação entre os grupos. Em asterístico, os resultados estatisticamente significantes. IAM=Infarto agudo do miocárdio, TLR=Toll Like Receptors, IL-6=Interleucina 6, TNF-α=Tumor Necrose factor-α, CP+=*Chlamydophila pneumoniae.*

Tabela 14 – Associação entre positividade para DNA de *Mp* e a expressão de mRNA dos genes TLR4, IL6, TLR2 e TNF-α em células do sangue periférico de indivíduos do grupo IAM.

Gene	Grupos		*P*
	MP+	MP-	
TLR4	0,00109±0,000789	0,00102±0,0000999	0,477
IL-6	0,0141±0,012	0,0534±0,035	0,507
TLR2	0,141±0,0437	0,347±0,0357	0,247
TNF-α	0,137±0,0454	0,239±0,0418	0,905

Nota: Valores são apresentados como media ± DP dos dados de 2^-ΔCt. Teste U de Wilcoxon-Mann-Whitney foi utilizado para avaliar a associação entre os grupos. Em asterístico, os resultados

estatisticamente significantes. IAM=Infarto agudo do miocárdio, TLR=Toll Like Receptors, IL-6=Interleucina 6, TNF-α=Tumor Necrose factor-α, MP+=*Mycoplasma pneumoniae.*

Tabela 15 – Associação entre positividade para IgG na diluição1:16 anti-*Chlamydophila pneumoniae* e a expressão de mRNA dos genes TLR4, IL6, TLR2 e TNF-α em células do sangue periférico de indivíduos do grupo IAM.

	Grupos		
Gene	CP IgG (1:16) +	CP IgG (1:16) -	*p*
TLR4	0,000878±0,000124	0,00125±0,000173	0,032
IL-6	0,0687±0,053	0,023±0,00749	0,076
TLR2	0,293±0,039	0,414±0,0647	0,279
TNF-α	0,209±0,0505	0,281±0,0662	0,313

Nota: Valores são apresentados como media ± DP dos dados de 2^-ΔCt. Teste U de Wilcoxon-Mann-Whitney foi utilizado para avaliar a associação entre os grupos. Em asterístico, os resultados estatisticamente significantes. IAM=Infarto agudo do miocárdio, TLR=Toll Like Receptors, IL-6=Interleucina 6, TNF-α=Tumor Necrose factor-α, CP=*Chlamydophila pneumoniae*, IgG=imunoglobulina G.

Tabela 16 – Associação entre positividade para IgG na diluição1:512 anti-*Chlamydophila pneumoniae* e a expressão de mRNA dos genes TLR4, IL6, TLR2 e TNF-α em células do sangue periférico de indivíduos do grupo IAM.

	Grupos		
Gene	CP IgG (1:512) +	CP IgG (1:512) -	*p*
TLR4	0,000753±0,000365	0,00104±0,000106	0,371
IL-6	0,00269±0,00162	0,0551±0,0358	0,005
TLR2	0,226±0,146	0,345±0,0352	0,131
TNF-α	0,0463±0,0335	0,248±0,0424	0,014

Nota: Valores são apresentados como media ± DP dos dados de 2^-ΔCt. Teste U de Wilcoxon-Mann-Whitney foi utilizado para avaliar a associação entre os grupos. Em asterístico, os resultados estatisticamente significantes. IAM=Infarto agudo do miocárdio, TLR=Toll Like Receptors, IL-

6=Interleucina 6, TNF-α=Tumor Necrose factor-α, CP=*Chlamydophila pneumoniae*, IgG=imunoglobulina G.

6.6 – Associação entre positividade dos agentes infecciosos e os marcadores inflamatórios

No grupo IAM, pacientes positivos para *Chlamydophila pneumoniae* tiveram maiores concentrações de fibrinogênio (541,778±161,535mg/dL) do que pacientes negativos para este agente infeccioso (450,5±196,793mg/dL), p=0.043 (Figura 21). Não obstante, nenhuma associação foi encontrada, no grupo IAM, em relação positividade de *Chlamydophila pneumoniae* e concentrações de IL-6 séricas (p=0,591), número de leucócitos (p=0.706), e concentração de PCRus (p=0.684) (Figura 14). Não se observou nenhuma associação entre positividade para *Mycoplasma pneumoniae* e os marcadores inflamatórios estudados.

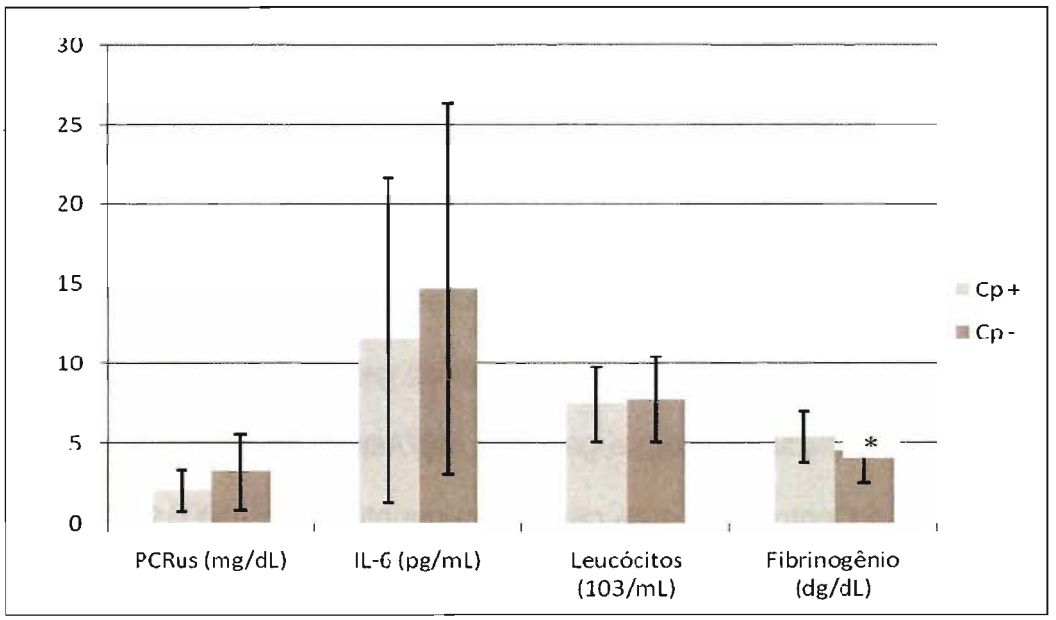

Figura 14 – Associação entre positividade para *Chlamydophila pneumoniae* (Cp) e concentrações séricas de PCRus, IL-6, fibrinogênio e números de leucócitos em indivíduos do grupo IAM.

6.7 Associação entre frequencia genotípica dos polimorfismos e IAM

As frequências dos genótipos dos polimorfismos -308G>A *TNF-α*, -260C>T *CD14*, Asp299Gli *TLR4*, Thr399Ile *TLR4* e Arg753Gln *TLR2* nos grupos IAM e GC estão expressas na tabela 17. Esses genes polimórficos não mostraram uma associação direta com o infarto agudo de miocárdio. Os resultados mostraram validade amostral, pois todos estavam em Equilíbrio de Hardy-Weinberg (tabela 18).

O polimorfismo -308G>A do gene *TNF-α* no grupo IAM apresentou distribuição de 81,60% portadores do genótipo GG e 18,40% GA, enquanto que no grupo Controle 83,61% apresentou genótipo GG, 13,10% GA e 3,30% AA, sem diferença significante entre os grupos estudados, p=0,832.

O polimorfismo -260C>T *CD14* teve a seguinte distribuição genotípica no grupo IAM: 38,80% possuíram o genótipo CC, 48,00% o genótipo CT e 13,3% com o genótipo TT e no grupo Controle: 42,6% tiveram o genótipo CC, 49,20% o genótipo CT e 8,2% com o genótipo TT. No entanto, utilizando o teste qui-quadrado para análise de proporções e também não mostrou uma diferença significante, entre os grupos estudados, p=0,605. Da mesma forma, a distribuição da frequencia do polimorfismo Asp299Gli (A+896G) *TLR4* entre os grupos estudados não foi estatísfticamente significante, p=0,556. Em adição, as distribuições genotípicas observadas no grupo IAM foi: 90,80% dos pacientes com o genótipo Asp/Asp e 9,20% carreavam o genótipo Asp/Gli e no grupo Controle: 93,40% carreavam genotipo Asp/Asp e 9,20% o genótipo Asp/Gli ou Gli/Gli. As distribuições genotípicas observadas no grupo IAM para o polimorfismo Thr399Ile *TLR4* foi: 92,90% dos pacientes com o genótipo Thr/Thr e

7,10% carreavam o genótipo Thr/Ile ou Ile/Ile e no grupo Controle: 90,20% portavam o genótipo Thr/Thr e 9,80% com o genótipo Thr/Ile ou Ile/Ile, essa distribuição entre os grupos estudados não foi estatísticamente significante, p=0,546.

Para o polimorfismo Arg753Gln *TLR2* as distribuições genotípicas observadas no grupo IAM foram: 99,0% com o genótipo Arg/Arg e 1,0% carreavam o genótipo Arg/Gln e no grupo Controle: 98,4% portavam o genótipo Arg/Arg e 1,60% com o genótipo Arg/Gln. A análise estatística da distribuição, não mostrou diferença significante entre os grupos estudados, p=1,000.

A associação entre a frequencia genotípica dos polimorfismos e os parâmetros sócio-demográficos está apresentada a seguir: Ao analisar todas as comparações de proporções entre os grupos para o polimorfismo -308G>A *TNF-α*, apenas houve associação entre os indivíduos portadores do genótipo -308GA *TNF-α* com hábito de fumar, uma maior freqüência (24%) de pacientes do grupo IAM que possuíam este hábito eram portadores do genótipo GA do que no grupo controle (12%), p=0,003. Para o polimorfismo -260C>T *CD14* houve diferença significante (p=0,004) entre o número de indivíduos do grupo IAM (12) com sobrepeso (acima de 25 kg/m^2), quando comparado ao grupo Controle (3), para os portadores do genótipo T/T.

Para o Polimorfismo Thr399Ile do TLR4 houve uma associação entre portadores do genótipo Thr/Thr e sobrepeso (IMC maior ou igual a 25 kg/m^2), com uma maior quantidade de pacientes do grupo IAM (64) com o genótipo Thr/Thr do que no grupo controle (32), p<0,0001.

Tabela 17 – Distribuição da freqüência genotípica dos SNPs -260C>T *CD14*, Asp299Gli, Thr399Ile *TLR4* e -308G>A *TNF-α* nos grupos IAM e controle.

Polimorfismo	IAM (100)	Controle (120)	
TNF-α -308G>A			
Genótipo GG	81.6 % (80)	83.6% (100)	x^2=0.108. df=1
GA+AA	18.4% (18)	16.4% (20)	*p*=0.742
Alelo A	11.0 %	8.3 %	p=0.364
CD14 -260C>T			
Genótipo CC	38.8%(38)	42.6%(51)	
CT	48.0%(47)	49.2%(59)	x^2=1.443. df=2
TT	13.3%(13)	8.2%(10)	*p*=0.486
Alelo T	37.2 %	32.9 %	p=0.364
TLR4 Asp299Gli			
Genótipo Asp/Asp	90.8%(89)	93.4%(114)	x^2=0.525. df=1
Asp/Gli+Gli/Gli	9.2%(9)	6.6%(8)	*p*=0.468
Alelo Gli	4.6 %	3.3 %	*p*=0.620
TLR4 Thr399Ili			
Genótipo Thr/Thr	92.9% (91)	90.2% (108)	x^2=0.553. df=1
Thr/Ile+Ile/Ile	7.1% (7)	9.8% (12)	*p*=0.477
Alelo Ile	3.6 %	5.0 %	*p*=0.492
TLR2 Arg753Gln			
Genótipo Arg/Arg	99.0% (97)	98.4% (118)	x^2=0.166. df=1
Arg/Gln+Gln/Gln	1.0% (1)	1.6% (2)	*p*=0.683
Alelo Gln	0.5 %	0.8 %	*p*=1.000

Nota: Valores são apresentados como número de indivíduos e entre parênteses a frequencia absoluta. Teste de distribuição qui-quadrado. IAM=infarto agudo do miocárdio.

Tabela 18 – Equilíbrio de Hardy-weinberg para os polimorfismos estudados.

	Grupos	
	IAM	Controle
-308G>A *TNF-α*	p>0,05	p>0,05
-260C>T CD14	p>0,05	p>0,05
Asp299Gli (A896G)	p>0,05	p>0,05
Thr399Ile (C1197T)	p>0,05	p>0,05
Arg753Gln (G2258A)	p>0,05	p>0,05

6.8. Associação entre os polimorfismos -308G>A do gene da *TNF-α*, -260C>T do gene *CD14*, Asp299Gli *e* Thr399Ile do gene *TLR4* e Arg753Gln do gene *TLR2* e positividade para agentes infecciosos

Não houve diferença estatística na análise entre a associção da presença da agente infeccioso com os vários genótipos dos diferentes genes estudados.

No grupo IAM, houve associação entre o genótipo -260CT+TT CD14 com títulos IgG anti-*Cp* detectados na diluição 1:16 (p=0,042). Os outros polimorfismos não foram associados com pacientes infartados com títulos positivos para IgG na diluição 1:16.

Pacientes portadores do genótipo -308GA/AA *TNF-α* tiveram uma maior proporção de soropositivos para títulos de IgG na diluição 1:512 do que pacientes infartados portadores do genótipo -308GG *TNF-α* (p=0,0058). No grupo IAM, indivíduos com títulos positivos para IgG na diluição 1:512 não foram associados com genótipos

dos polimorfismos estudados: -260C>T *CD14*, Asp299Gli *TLR4*, Thr399Ile *TLR4* e Arg753Gln *TLR2*.

6.9. - Associação entre os polimorfismos -308G>A *TNF-α*, -260C>T *CD14*, Asp299Gli *TLR4*, Thr399Ile *TLR4* e Arg753Gln *TLR2* e expressão dos genes TLR4, IL-6, TLR2 e TNF-α.

Nenhuma associação foi observada entre os polimorfismos estudados e a expressão gênica em nenhum dos grupos estudados. A saber, no grupo IAM, portadores do genótipo CC para o polimorfismo -260C>T CD14 teve valores médios menores de expressão do gene IL-6 (0,0158±0,034) do que os portadores do genótipo CT+TT (0,0244±0,0421), porém esta diferença não foi estatisticamente significante p=0,201 (Tabela 19).

Tabela 19 – Associação entre o polimorfismo -260C>T CD14 e a expressão de mRNA dos genes TLR4, IL6, TLR2 e TNF-α em células do sangue periférico de indivíduos do grupo IAM.

	Genótipos -260C>T CD14		
Gene	CC	CT+TT	*P*
TLR4	0,0011±0,0002	0,0011±0,0001	0,407
IL-6	0,0158±0,0058	0,0244±0,0055	0,201
TLR2	0,3300±0,0624	0,384±0,0459	0,332
TNF-α	0,2600±0,0871	0,276±0,0508	0,238

Nota: Valores são apresentados como media ± DP dos dados de 2^-ΔCt. Teste U de Wilcoxon-Mann-Whitney.

7. DISCUSSÃO

A escolha de pacientes e indivíduos controles foi um dos parâmetros mais complicados neste estudo, pois geralmente em nosso estudo os pacientes que tiveram infarto agudo do miocárdio possuíam os fatores biodemográficos e de riscos clássicos que estão associados com a fisiopatogenia desta doença, como, por exemplo, ser do gênero masculino, ser diabético e estes estão mais freqüentes no grupo caso em relação ao controle, mesmo com nossa preocupação em igualar a frequencia destes entre os dois grupos estudados. A alta freqüência destes fatores de riscos é também encontrada em diversos estudos sobre IAM (Nishiyama et al., 2010; Merry et al., 2011).

A maior proporção do sexo masculino no grupo IAM pode ser justificada pela proteção estrogênica em mulheres verificada antes do climatério (Sasaki et al., 2006; Piro et al., 2010).

A caracterização da cor da pele foi realizada de acordo com um questionário em que o próprio indivíduo se auto-caracterizava e a maior prevalência de brancos em nossa casuística é um dado comum à literatura (Hilden et al., 2010), apesar da grande miscigenação racial existente em nosso país (Strunz et al., 2011).

Segundo Elkind et al. e Tolstrup et al., o consumo leve a moderado de bebidas alcoólicas, isto é, uma a duas doses por dia, associa-se à diminuição da razão de risco para a incidência de Doença Arterial Coronária e Acidente Vascular Cerebral, em comparação seja com a abstinência total de álcool, seja com seu consumo excessivo. A explicação para esta a associação entre consumo moderado de álcool e diminuição

de risco para infarto agudo do miocárdio seria por que o álcool em determinadas concentrações inibiria a agregação plaquetária, reduzindo o fibrinogênio que é trombosante, aumentando a capacidade antioxidante, sobretudo os compostos fenólicos e os flavonóides do vinho e melhorado a fibrinólise, isto é, aumenta o t-PA e reduz o PAI-1. Em nosso estudo, observou-se que pacientes e indivíduos controles que consumiam moderadamente álcool possuíram, em média, concentrações de fibrinogênio menores que indivíduos que não consumiam álcool ou que consumiam em excesso corroborando assim com os resultados destes outros estudos (Elkind et al., 2006; Tolstrup et al., 2006). Por outro lado, o consumo excessivo do álcool é considerado fator de risco para o desenvolvimento de infarto agudo, principalmente pela sua associação com aumento da pressão arterial sistêmica (Lucas et al., 2005; Kahkonen et al., 2010). Pacientes que consumiam excessivamente álcool foram mais freqüentes em indivíduos que tiveram infarto do miocárdio em comparação aos controles, este resultado corrobora com a importância do consumo moderado de álcool para prevenção do desenvolvimento desta doença (Kahkonen et al., 2010).

Estimam que o risco de um paciente diabético em desenvolver a doença coronariana é duas a três vezes maior do que um indivíduo não-diabético (Heidemann et al., 2009; Kerimova et al., 2010) e que apesar de ter sido descrita redução da mortalidade geral em eventos agudos coronarianos, estes índices de mortalidade referentes ao diabetes estão se elevando (Kerimova et al., 2010). Confirmando esses achados, observa-se no presente estudo um expressivo aumento da prevalência de diabetes entre os pacientes com IAM ao analisarmos as glicemias realizadas no período de internação. A razão pela qual a diabetes influencia na fisiopatologia da

aterosclerose está no risco de pacientes com diabetes tipo II desenvolverem resistência a insulina, de modo que o pâncreas continua produzindo esse hormônio crítico em abundância na tentativa de vencer a resistência à insulina. Existem algumas evidências científicas de que os altos níveis de insulina no sangue provocam mudanças prejudiciais na parede dos vasos sangüíneos que elevam o risco de aterosclerose (Kerimova et al., 2010). Outros pesquisadores enfatizam que as concentrações elevadas de glicose no sangue resultam em uma reação química entre a glicose e as proteínas no corpo produzindo compostos chamados de produtos finais de glicosilação avançada. Estas proteínas glicosiladas facilitam a predisposição de doenças (Goyal et al., 2009; Sanjuan et al., 2011).

O tabagismo é um dos principais fatores de riscos para infarto agudo do miocárdio. Isto se deve ao fato que algumas substâncias presentes em cigarros caem na circulação, desencadeando uma disfunção endotelial que esta é considerada o início do desenvolvimento do processo da aterosclerose coronariana (Lightwood and Glantz, 2009; Villalbi et al., 2009). Observa-se no presente estudo uma maior freqüência de pacientes com hábito de fumar em indivíduos do grupo IAM.

Foi observada uma maior freqüência de pacientes hipertensos no grupo IAM em relação ao grupo controle. Isto deve ser explicado pelo importante papel desempenhado pela hipertensão arterial no desenvolvimento da aterogênese, que ocorre por meio da indução de modificações estruturais e funcionais da parede arterial, e também por alterações na função plaquetária. Além disso, sendo a hipertensão arterial uma causa importante de lesão endotelial, favorece a penetração de lipoproteínas na parede do vaso (Nilsson et al., 2009). Kang et al., 2009 relataram a

importância da hipertensão no aumento dos índices de mortalidade em pacientes que tiveram infarto do miocárdio, enfatizando que hipertensão é um fator de risco importante em todos os estágios de desenvolvimento da aterosclerose (Kang et al., 2009).

7.1 Valores bioquímicos e hematológicos

De acordo com o perfil inflamatório foi observado que o grupo IAM apresentou concentrações mais elevados de IL-6, PCRus e fibrinogênio que o grupo controle. Essas concentrações mais elevadas caracterizam um perfil inflamatório mais acentuado, o que vem de acordo com a teoria de que o infarto agudo do miocárdio é uma doença inflamatória (Libby et al., 2010; Hwang et al., 2011).

A produção hepática da PCRus é fundamentalmente modulada pela IL-6, embora a IL-1 e o fator de necrose tumoral alfa também participem desta modulação (Nordestgaard and Zacho, 2009). Assim, pode-se justificar a correlação positiva encontrada em nosso estudo entre concentrações de PCRUS e concentrações de IL-6. Estudos clínicos têm demonstrado que marcadores de inflamação sistêmica são fortes preditores de eventos clínicos na doença arterial coronariana (de Winter et al., 1999; Kablak-Ziembicka et al., 2010). Nos pacientes com infarto agudo do miocárdio, concentrações mais elevadas de PCRus correlacionaram-se com maior extensão da área de necrose miocárdica (Pietila et al., 1993). A PCRus pode refletir a atividade de citocinas pro-inflamatórias circulantes (Kettunen et al., 2011).

O fibrinogênio, além de ser fator de risco para doença coronária, está associado com os tradicionais fatores de risco cardiovascular, sugerindo que o

aumento do mesmo pode ser o mecanismo pelo quais tais fatores exerçam seu papel (Tosetto et al., 2011). A importância desta glicoproteína como marcador de inflamação sistêmica pode explicar a associação encontrada no presente estudo entre concentrações elevadas de fibrinogênio e positividade para DNA *Chlamydophila pneumoniae* nos pacientes infartados. Lowe *et al.*, em 1991, também relataram que o aumento dos níveis plasmáticos de fibrinogênio está associado a doença coronariana (Lowe et al., 1991).

As plaquetas são fragmentos citoplasmáticos anucleados, presente no sangue e a plaquetogênese ocorre na medula óssea. A sua principal função é a formação de coágulos, participando do processo de coagulação sanguínea. O número de plaquetas aumentado exerce um papel importante na patogênese das síndromes coronarianas agudas. A ruptura da placa aterosclerótica com exposição de componentes trombogênicos facilita a ativação e o conseqüente depósito de plaquetas no local, atuando como elemento fundamental na formação do trombo arterial responsável pela oclusão parcial ou total da coronária relacionada ao evento (Ishii and Yoshida, 2011). O conhecimento de sua fisiologia, que permitiu a identificação dos diversos mecanismos de ativação, adesão e agregação plaquetárias, como os induzidos por difosfato de adenosina, e ativação das integralinas, como glicoproteínas IIb/IIIa, foi e tem sido determinante na geração de novos fármacos para o tratamento das síndromes coronárias agudas (Aukrust et al., 2010). As plaquetas são ativadas precocemente no curso da terapia fibrinolítica e a expressão dos receptores de glicoproteína IIb/IIIa, das moléculas de adesão endotélio/plaquetas, e de liberação de inibidor do plasminogênio tecidual fica aumentada nas primeiras 24h (Lindemann et al.,

2007). O trombo, rico em plaquetas, é mais resistente à lise pelos fibrinolíticos, em relação aos trombos de hemácias e fibrina. Assim como esperado, neste presente estudo foram encontradas quantidades mais elevadas de plaquetas em pacientes do grupo IAM em comparação ao grupo controle. Estes resultados enfatizam que os pacientes do grupo IAM estivessem sob risco trombótico aumentado, pois apresentavam aumento das concentrações plasmáticas de fibrinogênio e plaquetas favorecendo a ocorrência de trombose e/ou vasoespasmo coronário. Outros estudos também enfatizaram esta associação (Yilmaz et al., 2007; Ashavaid et al., 2010).

Assim como em nosso trabalho, outras pesquisas associaram o aumento no número de células do sangue periférico envolvidas na inflamação, como leucócitos, linfócitos e monócitos com indivíduos que tiveram infarto agudo do miocárdio (Akatsu et al., 2003; Sezer and Umman, 2008). Um dos mais relevantes incluiu a leucocitose como parte de um escore de risco para pacientes com infarto (Zhang et al., 2003). Os leucócitos podem ser ativados por lesão tecidual, pela presença de LDL-c oxidado, ou pela presença de agente infeccioso na parede vascular (Sakurai-Komada et al., 2010). Uma vez ativados, iniciam a produção de diferentes citocinas. Especialmente, a interleucina-6 estimula os hepatócitos a produzir RNAm para produção de proteínas de fase aguda (fibrinogênio, PCRUS, amilóide sérico A). Possivelmente, o aumento do número de leucócitos durante o infarto agudo do miocárdio pode ser explicado pela capacidade destas citocinas e proteínas de fase aguda de ativar a diferenciação celular na medula óssea das células precursoras em leucócitos (Boudjeltia et al., 2008).

Na fisiopatologia da formação das placas de ateroma, uma das substâncias fundamentais para o seu desenvolvimento é a presença de colesterol, principalmente

do LDL-c e, como esperado, este presente estudo relacionou concentrações elevadas de LDL-c e infarto agudo do miocárdio Alguns estudos mostraram que a maioria dos pacientes com IAM apresentava LDL-c alto, correlacionando os valores com a gravidade da aterosclerose (Shekelle et al., 1981; Barter et al., 2007; Gomez et al., 2009). A ocorrência, neste presente estudo, de concentrações elevadas de triglicérides em indivíduos que tiveram infarto agudo está de acordo com vários trabalhos da literatura. É possível que a hipertrigliceridemia tenha papel importante na gênese do IAM (Langsted et al., 2010). Triglicérides podem atuar diretamente na parede arterial, propiciando a formação de lesões ateroscleróticas e influenciando o metabolismo e a composição das VLDL (LDL densas e pequenas) que estão freqüentemente associadas à hipertrigliceridemia (Aidyraliev et al., 2010).

Valores baixos de HDL-c constituem fator de risco preponderante no IAM, principalmente quando associados a hipertrigliceridemia (Barter et al., 2007). Valores elevados de glicose foram encontrados em nosso estudo contribuindo ainda mais para confirmar a importância da diabetes como fator de risco para o desenvolvimento do infarto (Sanjuan et al., 2011).

7.2 – Associação entre agentes infecciosos e infarto agudo do miocardio

Desde os primeiros relatos sobre lesões ateroscleróticas e, principalmente, nos últimos trinta anos, avanços extraordinários foram obtidos referentes aos mecanismos celulares e moleculares da aterogênese. Esses avanços desenvolvem-se em paralelo ao crescimento da compreensão da Biologia Vascular, homeostase e metabolismo lipídico (Higuchi et al., 2000; Sakurai-Komada et al., 2010). A interação

inflamação-infecção na aterogênese, também, é de fundamental importância para os avanços neste processo, o qual é complexo e multifatorial. Infecções bacterianas, tais como: *C. pneumoniae*, *M. pneumoniae*, podem desencadear a secreção de citocinas inflamatórias, conduzindo à aterogênese. Para o desenvolvimento da aterosclerose é fundamental que exista a formação de um processo inflamatório crônico que é similar ao processo desenvolvido durante uma infecção crônica. Fabricant e cols (Fabricant et al., 1978) foram os primeiros pesquisadores que experimentalmente induziram a aterosclerose em galinhas pela inoculação do vírus da doença de Marek. Desde então, ambos, os vírus e as bactérias têm sido implicados na aterosclerose. Entretanto, nenhum microorganismo tem atraído grandes atenções, exceto *C. pneumoniae* e *M. pneumoniae*. Em adição, *C. pneumoniae* e *M. pneumoniae* em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) poderia servir como um fator de risco para DAC, se esses microorganismos se espalharem às placas ateroscleróticas através das células do sangue periférico infectadas ou se placas infectadas liberarem estas células cheias de *C. pneumoniae* e *M. pneumoniae* na circulação. Pesquisas em modelos experimentais de infecção por *C. pneumoniae* sugerem a passagem da *C. pneumonia* do pulmão a células vasculares através de células mononucleares de sangue periférico (Belland et al., 2004; Campbell and Kuo, 2004; Gieffers et al., 2004). Além de monócitos, neutrófilos circulantes também podem conter *C. pneumoniae* (Berger et al., 2000), independentemente da associação com a aterosclerose. Isso pode explicar a positividade, encontrada no presente estudo, de *C. pneumonia e M. pneumoniae* em células do sangue periférico de indivíduos pertencentes ao grupo controle. A detecção dos agentes infecciosos em células do sangue periférico sugere que esta é uma das

vias pelas quais atingem a parede do vaso através da infiltração leucocitária e com isso contribuindo para aumentar a inflamação local na camada íntima da artéria e este processo sendo de extrema importância para o aparecimento da manifestação clínica do infarto.

7.2.1 *Chlamydophila pneumoniae*

A *Chlamydophila pneumoniae* é uma bactéria gram-negativa e parasita intracelular obrigatória. Esta bactéria é responsável por aproximadamente 10% dos casos de pneumonia, 5% dos casos de bronquite e sinusites em adultos. *Chlamydophila pneumoniae* em células do sangue periférico entra em um estado vegetativo e persistente de resistência a antibiótico, mas viável (Gieffers et al., 2001; Hogan et al., 2004). Isto pode explicar os resultados negativos de estudos com uso de antibióticos como prevenção secundária contra doenças da artéria coronária (Watson and Alp, 2008) por que o tratamento com antibiótico não garante a completa eliminação da bactéria do organismo, por isso esta bactéria pode estar contribuindo de forma crônica para a aterogênese sem que haja um eficaz combate do organismo contra o desenvolvimento deste processo.

Acredita-se que a *Chlamydophila pneumoniae* seja a principal candidata das bactérias relacionadas com a aterosclerose, pois além do que já explicado, os sinais e sintomas se confundem com o de viroses e ao invés de se usar o tratamento com antibiótico que de certa forma ainda é ineficaz, se usa antivirais e muitas vezes nem existe um tratamento (Campbell and Kuo, 2004; Cao et al., 2007; Blasi et al., 2009). Nosso resultado que mostra positividade para *C. pneumoniae* em ambos os grupos

estudados corrobora com essas hipóteses, pois nenhum de nossos pacientes e indivíduos controles estava em tratamento com antibióticos e nem relataram o diagnóstico desta infecção em períodos passados.

Entre os anos de 1992 e 2000, mais de quarenta estudos foram publicados na detecção de *C. pneumoniae* em tecidos vasculares. As técnicas mais usadas foram a Imunohistoquímica e a PCR, mas também foi usada Microscopia Eletrônica, Cultura de Células, Imunofluorescência e Hibridização *in situ* (Boman and Hammerschlag, 2002).

Kozarov et al. (2006) analisaram 129 placas de ateroma para pesquisa de dez espécies de microorganismos, através da técnica de PCR em tempo real, utilizando o sistema SYBR Green, detectando positividade de, aproximadamente, 50% de CP e de Actinobacillus actinomycetemcomitans (A.a.), porém concluíram que a quantidade de CP em proporção ao DNA total foi mínima.

Estudos analisaram aortas ascendentes de pacientes com doenças coronarianas e revelaram positividade de 30% para CP, pela PCR em tempo real e 50% pela PCR *nested* (Nystrom-Rosander et al., 2006). Pesquisas em biópsias de artérias torácicas internas demonstraram positividade de 15,15% para CP, pela PCR em tempo real (Iriz et al., 2007). Outros estudos, em placas ateroscleróticas de carótidas, detectaram positividade de 36,66% para CP e demonstraram que a quantificação em células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMC) é melhor para avaliar a infecção clamidial (Sessa et al., 2007). Por outro lado, outras pesquisas não detectaram positividade de CP, em PBMC, de pacientes com carótidas ateroscleróticas ecolucentes ou ecogênicas (Halvorsen et al., 2007).

Wang et al. (2007) analisaram 269 amostras sanguíneas de portadores de doenças arterio-coronarianas (DAC) e concluíram que a presença do DNA de CP, circulante nos vasos, possui associação com o avanço da doença, contribuindo com a progressão da aterosclerose coronariana.

Existem vários trabalhos que pesquisaram CP em células do sangue periférico de pacientes com doença vascular aterosclerótica (Rassu et al., 2001; Aso et al., 2004; Watson and Alp, 2008; West et al., 2009), porém estes estudos demonstraram uma positividade muito variada entre 0 a 100%. No entanto, a justificativa para valores tão diferentes pode estar na definição de resultados positivos, na quantidade de replicatas realizadas, métodos de identificação e controle de cada laboratório (Boman and Hammerschlag, 2002). Em adição, alguns estudos relataram uma influência sazonal nos índices de positividade para DNA de *Chlamydophila pneumoniae* em células do sangue periférico, sendo que um aumento de positividade estaria associado com meses mais frios (Rassu et al., 2001; Smieja et al., 2001; Boman and Hammerschlag, 2002). Poucos estudos tem se voltado para esta questão, mas alguns estudos relataram que a pesquisa de DNA de *Chlamydophila pneumoniae* em células do sangue periférico pode variar de acordo com o período do dia (Muller et al., 2004). Outro fator importante que pode justificar resultados tão diferentes é a inconsistência das reações da PCR como, por exemplo, diferentes genes alvos, procedimento de amplificação e métodos de detecção. Esta inconsistência foi destacada em uma comparação multicêntrica em que as amostras foram analisadas em nove centros pela PCR e a positividade variou de 0 a 60% com nenhuma concordância entre os laboratórios para espécie individual (Apfalter et al., 2001).

Um dos resultados mais interessantes deste estudo está na associação entre positividade para DNA de *Chlamydophila pneumoniae* e concentrações séricas de fibrinogênio, pois este resultado sugere que esta bactéria pode estar relacionada ao infarto agudo do miocárdio pela ativação de moléculas que podem aumentar a produção de fibrinogênio e com isso contribuindo para o infarto agudo do miocárdio.

Ensaio de imunofluorescência indireta foi utilizado para determinação de anticorpos anti-*Clamydophila pneumoniae* e não foi encontrada nenhuma diferença significante na prevalência de títulos anti-IgG entre os grupos IAM e Controle. Este resultado está em contraste com publicações mais antigas que sugerem que anticorpos são encontrados mais frequentes em pacientes com doença da artéria coronária (Hoshida et al., 2005), mas em concordância com publicações mais recentes (Watson and Alp, 2008; West et al., 2009).

7.2.2 Mycoplasma pneumoniae

Pickens e Catterall (1978) afirmam que a primeira associação do *M. pneumoniae* com doenças cardiovasculares foi descrita em 1944, por Finkelstein e Klainer (Pickens and Catterall, 1978). Os primeiros pesquisadores relatam um caso de um paciente com infecção provocada por MP apresentando complicações como miocardite e coagulação intravascular disseminada, esta última já foi descrita conjuntamente às infecções bacterianas e virais, porém sua ocorrência em infecções por MP é raro.

A análise genômica de *M. pneumoniae* revelou a existência de um grande número de genes de lipoproteínas comparados a outras bactérias. Contudo, o papel

patogênico das lipoproteínas do MP ainda é desconhecido (Into et al., 2007).

Templeton et al. (2003) compararam o método sorológico com a PCR em tempo real (iCycler IQ da BioRad), para pesquisa de *M. pneumoniae* em amostras de pacientes com infecção no trato respiratório. Concluíram que os métodos moleculares são melhores no diagnóstico desse agente infeccioso, oferecendo menor tempo no diagnóstico e de execução (Templeton et al., 2003).

Iriz et al. (2007) analisaram biópsias aórticas sem placas de ateroma visíveis e biópsias de artérias torácicas internas para pesquisas de DNA de MP, pela PCR em tempo real, e não detectaram positividade, apenas para pesquisa de CP (Iriz et al., 2007).

Através da PCR convencional, empregando um conjunto de reagentes de extração QIAamp DNA, em amostras arteriais de portadores de doenças cardíacas, constatou-se positividade de 2,5% em amostras de coronárias e de 3% em amostras de válvulas cardíacas. Fizeram uma contraprova e não havia inibidores de PCR nas amostras de DNA, concluindo que o MP não é um importante fator para o desenvolvimento de doenças vasculares (Maraha et al., 2000).

O *M. pneumoniae* é um dos menores e mais simples procariotos, não possuindo membrana celular e com genoma bem reduzido (580~2.200 kb). O tamanho e volume reduzido permitem atravessar filtros porosos de 0,45 µm de diâmetro. Sua massa celular não permite detecção através do microscópio óptico e não produz turbidez em líquido (Waites and Talkington, 2004). Por conseguinte, esta bactéria seria capaz de ser extraída pelos conjuntos de reagentes neste estudo.

A presença de *Mycoplasma pneumoniae* já foi encontrada presentes em

placa de ateroma e até a sua co-infeccao com *Chlamydophila pneumoniae* (Momiyama et al., 2004; Higuchi-Dos-Santos et al., 2005). Neste presente estudo, a positividade para *M. pneumoniae* não foi associada com o infarto agudo do miocárdio, porém, a existência de indivíduos positivos para *M. pneumoniae* nos grupos estudados sugere que esta bactéria seja um patógeno encontrado em baixas quantidades no organismo sem que exista uma reação do organismo para com este agente infeccioso, pois muitas vezes seus sintomas são confundidos com umasimples gripe ou o tratamento com antibiótico não garante a completa eliminação da bactéria do organismo (Berger et al., 2000; Natori et al., 2010).

7.3 Associação entre polimorfismos em genes inflamatórios e infarto agudo do miocárdio

A escolha dos polimorfismos -260C>T *CD14*, -308G>A *TNF-α*, Asp299Gli *TLR4*, Thr399ThrIle *TLR4*, Arg753Gln *TLR2* para o estudo ocorreu devido a possibilidade de indivíduos portadores de determinados genótipos possuirem células que expressarão RNAm diferenciado ou proteínas com estrutras diferentes que grupo de indivíduos portadores de um genótipo diferente e assim caracterizar determinados grupos de pessoas que possuem prediposição ao surgimento de determinadas doenças, como neste trabalho, do infarto agudo do miocárdio. O processo inflamatório resultante da ativação destes genes é fundamental para a manisfestação do infarto agudo do miocárdio. Além disso, uma possível associação destes polimorfismos com susceptibilidade a infecção já foi publicada na literatura (Eng et al., 2003; Schroder and Schumann, 2005; Yin et al., 2010; Dalgic et al., 2011).

7.3.1 CD14

O polimorfismo -260C>T *CD14* altera a região promotora do gene CD14 e com isso, pode dificultar a expressão de RNAm de CD14 devido a interação entre fatores de transcrição e gene estar dificultada ou até mesmo impedida e como consequencia este polimorfismo já foi associado com diversas doenças inflamatórias (Fallavena et al., 2009; Rizzello et al., 2010; Ertan et al., 2011).

A distribuição genotípica observada do polimorfismo -260C>T *CD14*, no grupo IAM e no grupo controle foi similar às observadas em alguns estudos (Arroyo-Espliguero et al., 2005; Bernardo et al., 2006), mas diferente da encontrada por outros estudos que também estudaram a associação deste polimorfismo com a doença da artéria coronária (Hubacek et al., 1999; Kondo et al., 2003; Kruger et al., 2005). Hubacek et al., 1999, relacionaram o genótipo TT com o infarto do miocárdio (Hubacek et al., 1999), no entanto, diversos trabalhos não encontraram o mesmo resultado, pois as distribuições dos genótipos entre os grupos IAM e controle não foram estatisticamente significantes (Zee et al., 2001; Nauck et al., 2002; Arroyo-Espliguero et al., 2004; Bernardo et al., 2006). Da mesma forma, este estudo não observou diferença significante entre a frequencia do polimorfismo nos grupos estudados e com isso não se pode associar a alteração no gene CD14 com o infarto agudo do miocárdio, a justificativa pode ser a diferença dos indivíduos participantes desses diferentes estudos em relação principalmente a etnia.

Pacientes portadores do genótipo com o alelo raro (CT ou TT) poderiam estar associados com infecção ou alteração dos marcadores inflamatórios como

descrito pela literatura (Eng et al., 2003; Lin et al., 2008; Poikonen et al., 2009) e o que foi observada neste estudo é que o genótipo -260CT/TT não esteve mais freqüente em pacientes positivos para DNA de *Chlamydophila pneumoniae,* nem em pacientes positivos para DNA de *Mycoplasma pneumonae* e com isso concluiu-se que este polimorfismo não predisporia determinado indivíduo a ter infecção por estes agentes infecciosos, sendo que esta conclusão estaria de acordo com outros estudos apresetados pela literatura (Ouburg et al., 2005; Kis et al., 2007).

7.3.2 TLRs

Os polimorfismos Asp299Gli, Thr399Ile *TLR4* e Arg753Gln *TLR2* afetam a codificação dos aminoácidos referentes a sua proteína e esta possui um sítio ativo que pode interagir de forma não eficiente com seu ligante e com isso conduzir o indivíduo a ter susceptibilidade a infecção. Esta susceptibilidade pode predispor o indivíduo a manifestar o infarto agudo do miocárdio ou prevenir esta manifestação por diminuição do processo inflamatório.

A distribuição genotípica do polimorfismo Asp299Gli (A+896G) *TLR4* (IAM: 93,1%; C: 98,2%) encontrada no presente estudo foi similar às observadas em suecos (Edfeldt et al., 2004), alemães (Nebel et al., 2007), norte americanos (Kolek et al., 2004) e em franceses (Ameziane et al., 2003) e para o polimorfismo Thr399Ile (C1197T) *TLR4* a distribuição genotípica foi similar às observadas em norte americanos (Kiechl et al., 2002), alemães (KOCH et al., 2006) e em suecos (Edfeldt et al., 2004). AMEZIANE et al, 2003, observou uma maior freqüência do genótipo Asp/Gli do polimorfismo Asp299Gli em controles (13,35%) em relação a pacientes IAM (7,7%),

p=0,054 (Ameziane et al., 2003). No presente estudo foi observado uma maior frequencia no grupo IAM (7,37%) do que no grupo controle (2,2%), porém não significante esta diferença, p=0.17. Embora alguns trabalhos possam ter encontrados distribuições diferentes, a maioria foi similar à encontrada neste estudo.

De acordo com a frequencia do polimorfismo Arg753Gln (G2258A) *TLR2*, o alelo raro A foi encontrado em apenas três indivíduos incluídos neste estudo mostrando uma baixa freqüência deste polimorfismo, tais como apresentada por outros estudos (Lorenz et al., 2000; Ogus et al., 2004; Sanchez et al., 2004; Hamann et al., 2005; Duzgun et al., 2007). Por outro lado, dois trabalhos demonstraram em seu grupo caso uma alta freqüência do alelo raro, Hamann et al., 2005, relacionaram o polimorfismo Arg753Gln com o risco de re-estenose da coronária (Hamann et al., 2005) e Ogus et al., 2004 relacionaram este polimorfismo com pacientes positivos para tuberculose (Ogus et al., 2004)..

7.3.3 TNF-α

O polimorfismo *-308G>A TNF*-α altera a região promotora do *TNF*-α e com isso, pode dificultar a expressão de RNAm devido a interação entre fatores de transcrição e a região promotora do gene estar dificultada ou até mesmo impedida de acontecer e como consequencia este polimorfismo pode ser responsável por uma alteração do processo inflamatório local, por isso, o polimorfismo *-308G>A TNF*-α foi associado com diversas doenças inflamatórias (Minhas et al., 2010; Xu et al., 2010; Kong et al., 2011). Para se comprovar tal afirmação é realizada uma comparação de freqüência dos genótipos do polimorfismo *-308G>A TNF*-α e como essa freqüência foi

similar entre os grupos estudados pode-se sugerir, neste trabalho, que este polimorfismo não influenciou o aparecimento do infarto agudo dc miocárdio. Curiosamente, existiu uma maior freqüência do alelo raro A no grupo controle. Interessantemente, Shevchenko et al., 2010, sugeriu que portadores do alelo A eram menos susceptível a ter infarto agudo do miocárdio (Shevchenko et al., 2010), assim como Harcos et al., 2006, que sugeriram uma associação entre portadores do alelo raro para o polimorfismo *-308G>A TNF*-α e acidente vascular celebral (Harcos et al., 2006). Por outro lado, Antonicelli et al., 2005 encontraram uma associação entre portadores do genótipo -308 GA+AA *TNF*-α e infarto agudo do miocárdio (Antonicelli et al., 2005). O que se pode justificar para a diferença de resultados encontrada entre nosso estudo e o desses outros autores é que a população participante deste estudo é muito miscigenada, pois é uma população bastante miscigenação.

7.4 Associação entre expressão gênica da IL-6, TNFA, TLR2/TLR4 e Infarto Agudo do Miocárdio

A análise da expressão gênica é um aspecto importante para a associação entre determinados marcadores protéicos e manifestações clínicas, pois o perfil de expressão gênica é resultado do estímulo atual recebido pela célula em determinadas condições. Como por exemplo, se determinadas células forem infectadas por *C. pneumoniae* ou *M. pneumoniae,* a interação bactéria ou produtos gerado por elas com seus receptores presentes nas células de defesa iriam desencadear uma cascata de ativação protéica resultando na transcrição de RNAm de genes inflamatórios (IL-6, TNFA, TLR2/TLR4) e como conseqüência, a intensificação do processo inflamatório e

possível manifestação do infarto agudo do miocárdio.

Neste estudo, houve uma associação entre menores expressões do gene *TLR4* e a manifestação do infarto agudo do miocárdio. Este resultado está em contraste com publicações recentes que indicaram um significante aumento da expressão dos genes TLR2 e TLR4 em células mononucleares do sangue periférico no grupo formado por pacientes com doença da artéria coronária do que no grupo controle (Fukushima et al., 2009). Outros estudos demonstraram a correlação positiva da expressão do gene *TLR4* com a proteína de membrana TLR4 em células mononucleares do sangue periférico (Yang et al., 2008; Liu et al., 2009). Estes resultados descritos acima nos induzem entender que uma diminuição da expressão do gene *TLR4* encontrada em nosso estudo refletiria uma diminuição da proteína TLR4. Porém, o que seria mais lógica em relação à fisiopatologia da aterosclerose era um aumento desta proteína que com isso aumentaria a inflamação induzindo assim a ruptura da placa e provocando o infarto agudo do miocárdio. De certa forma existe uma variável que dificilmente podemos controlar e que poderia estar afetando este resultado que é a automedicação. De todos os pacientes deste estudo, foram coletadas amostras de sangue periférico antes da medicação fornecida pelo hospital, pois o uso de algumas medicações pode afetar a expressão do gene TLR4 e existe a possibilidade de muitos pacientes que se automedicaram, como por exemplo, pacientes que usaram ácido acetil salicílico antes de chegar ao hospital terem sidos incluídos neste estudo, logo uma possível explicação para diminuição da expressão de TLR4 pode ser a automedicação.

Com tudo isso que foi discutido anteriormente, um assunto deve ser

discutido, pois a expressão dos genes IL-6, TLR2 e TNF-α estava ligeiramente aumentada no grupo IAM comparadas ao grupo controle. Então, se fatores que são dificilmente evitados em estudos com pacientes pode estar causando a diminuição da expressão do gene TLR4, consequentemente, os genes IL-6, TLR2 e TNF-α poderiam estar relacionados com o infarto agudo do miocárdio.

Mesmo que essa argumentação baseada em hipótese seja viável, seria importante saber se esta diminuição na expressão de TLR4 ou o aumento não significativo da expressão dos genes TLR2, IL-6 e TNF-α estaria relacionado com a positividade para DNA de *Chlamydophila pneumoniae* e DNA de *Mycoplasma pneumonae*. Portanto, não se observou nenhuma associação entre positividade para DNA de *Chlamydophila pneumoniae, Mycoplasma pneumoniae* e a expressão dos genes TLR4, IL-6, TLR2 e TNF-α. Este resultado sugere que a ativação celular por agentes infecciosos pode ocorrer localmente, provavelmente depois da ativação e diferenciação do monócito em macrófago ou após a diferenciação dos agentes infecciosos do estado vegetativo para a forma ativa.

8. CONCLUSÕES

A presença de infecção por *C. pneumoniae* ou *M. pneumoniae* não foi associado com o infarto agudo do miocárdio, assim como não foi associada com uma susceptibilidade genética.

As frequencias genotípicas e alélicas dos polimorfismos Arg753Gln (G+2258A) do gene TLR2, Asp299Gli (A+896G), Thr399Ile (C+1197T) do gene TLR4, -260C>T do gene CD14 e *-308G>A TNF*-α não tiveram associação com a ocorrência de infarto agudo do miocárdio.

A expressão de mRNA do *TLR4* foi associado com o IAM, mostrando a importância da sinalização inflamatória para o aparecimento do IAM. Por outro lado, a expressão de mRNA do TLR-2 e das citocinas IL-6 e TNF-α não foi associado com o IAM.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

2007. [Guidelines for Unstable Angina and Non-ST-Segment Elevation Myocardial Infarction of the Brazilian Society of Cardiology (II Edition,2007)]. Arq Bras Cardiol 89:e89-131.

Aidyraliev RK, Rezepkina LB, Igemberdieva OA, Beishenkulov MT, Aldashev AA. 2010. [Study of blood cholesterol and triglycerides in patients with acute myocardial infarction]. Klin Lab Diagn:25-26.

Akasaka T, Kubo T, Mizukoshi M, Tanaka A, Kitabata H, Tanimoto T, Imanishi T. 2010. Pathophysiology of acute coronary syndrome assessed by optical coherence tomography. J Cardiol 56:8-14.

Akatsu T, Nakamura M, Satoh M, Hiramori K. 2003. Increased mRNA expression of tumour necrosis factor-alpha and its converting enzyme in circulating leucocytes of patients with acute myocardial infarction. Clin Sci (Lond) 105:39-44.

Ameziane N, Beillat T, Verpillat P, Chollet-Martin S, Aumont MC, Seknadji P, Lamotte M, Lebret D, Ollivier V, de Prost D. 2003. Association of the Toll-like receptor 4 gene Asp299Gly polymorphism with acute coronary events. Arterioscler Thromb Vasc Biol 23:e61-64.

Antonicelli R, Olivieri F, Cavallone L, Spazzafumo L, Bonafe M, Marchegiani F, Cardelli M, Galeazzi R, Giovagnetti S, Perna GP, Franceschi C. 2005. Tumor necrosis factor-alpha gene -308G>A polymorphism is associated with ST-elevation myocardial infarction and with high plasma levels of biochemical ischemia markers. Coron Artery Dis 16:489-493.

Apfalter P, Blasi F, Boman J, Gaydos CA, Kundi M, Maass M, Makristathis A, Meijer A, Nadrchal R, Persson K, Rotter ML, Tong CY, Stanek G, Hirschl AM. 2001. Multicenter comparison trial of DNA extraction methods and PCR assays for detection of Chlamydia pneumoniae in endarterectomy specimens. J Clin Microbiol 39:519-524.

Armant MA, Fenton MJ. 2002. Toll-like receptors: a family of pattern-recognition receptors in mammals. Genome Biol 3:REVIEWS3011.

Arroyo-Espliguero R, Avanzas P, Jeffery S, Kaski JC. 2004. CD14 and toll-like receptor 4: a link between infection and acute coronary events? Heart 90:983-988.

Arroyo-Espliguero R, El-Sharnouby K, Vazquez-Rey E, Kalidas K, Jeffery S, Kaski JC. 2005. CD14 C(-260)T promoter polymorphism and prevalence of acute coronary syndromes. Int J Cardiol 98:307-312.

Ashavaid TF, Todur SP, Kondkar AA, Nair KG, Shalia KK, Dalal JJ, Rajani R, Ponde CK. 2010. Platelet polymorphisms: Frequency distribution and association with coronary artery disease in an Indian population. Platelets.

Aso N, Tamura A, Kadota J, Nasu M. 2004. Association of peripheral mononuclear cells containing Chlamydia pneumoniae DNA with acute coronary syndrome and stable coronary artery disease in Japanese subjects. Clin Infect Dis 39:366-372.

Aukrust P, Halvorsen B, Ueland T, Michelsen AE, Skjelland M, Gullestad L, Yndestad A, Otterdal K. 2010. Activated platelets and atherosclerosis. Expert Rev Cardiovasc Ther 8:1297-1307.

Barter P, McPherson YR, Song K, Kesaniemi YA, Mahley R, Waeber G, Bersot T, Mooser V, Waterworth D, Grundy SM. 2007. Serum insulin and inflammatory markers in overweight individuals with and without dyslipidemia. J Clin Endocrinol Metab 92:2041-2045.

Belland RJ, Ouellette SP, Gieffers J, Byrne GI. 2004. Chlamydia pneumoniae and atherosclerosis. Cell Microbiol 6:117-127.

Bennet AM, Prince JA, Fei GZ, Lyrenas L, Huang Y, Wiman B, Frostegard J, Faire U. 2003. Interleukin-6 serum levels and genotypes influence the risk for myocardial infarction. Atherosclerosis 171:359-367.

Berger M, Schroder B, Daeschlein G, Schneider W, Busjahn A, Buchwalow I, Luft FC, Haller H. 2000. Chlamydia pneumoniae DNA in non-coronary atherosclerotic plaques and circulating leukocytes. J Lab Clin Med 136:194-200.

Bernardo E, Angiolillo DJ, Ramirez C, Cavallari U, Trabetti E, Sabate M, Hernandez R, Moreno R, Escaned J, Alfonso F, Banuelos C, Costa MA, Bass TA, Pignatti PF, Macaya C, Fernandez-Ortiz A. 2006. Influence of the CD14 C260T promoter polymorphism on C-reactive protein levels in patients with coronary artery disease. Am J Cardiol 98:1182-1184.

Blasi F, Tarsia P, Aliberti S. 2009. Chlamydophila pneumoniae. Clin Microbiol Infect 15:29-35.

Boman J, Hammerschlag MR. 2002. Chlamydia pneumoniae and atherosclerosis: critical assessment of diagnostic methods and relevance to treatment studies. Clin Microbiol Rev 15:1-20.

Boudjeltia KZ, Brohee D, Piro P, Nuyens V, Ducobu J, Kherkofs M, Van Antwerpen P, Cauchie P, Remacle C, Vanhaeverbeek M. 2008. Monocyte-platelet complexes on CD14/CD16 monocyte subsets: relationship with ApoA-I levels. A preliminary study. Cardiovasc Pathol 17:285-288.

Brandao AA, Rodrigues CI, Consolim-Colombo F, Plavnik FL, Malachias MV, Kohlmann Jr O, Amodeo C, Poli-de-Figueiredo CE, Ferreira Filho S. 2010. [VI Brazilian Guidelines on Hypertension]. Arq Bras Cardiol 95:1-51.

Campbell LA, Kuo CC. 2004. Chlamydia pneumoniae--an infectious risk factor for atherosclerosis? Nat Rev Microbiol 2:23-32.

Campbell LA, Yaraei K, Van Lenten B, Chait A, Blessing E, Kuo CC, Nosaka T, Ricks J, Rosenfeld ME. 2010. The acute phase reactant response to respiratory infection with Chlamydia pneumoniae: implications for the pathogenesis of atherosclerosis. Microbes Infect 12:598-606.

Cao F, Castrillo A, Tontonoz P, Re F, Byrne GI. 2007. Chlamydia pneumoniae--induced macrophage foam cell formation is mediated by Toll-like receptor 2. Infect Immun 75:753-759.

Carty CL, Heagerty P, Heckbert SR, Enquobahrie DA, Jarvik GP, Davis S, Tracy RP, Reiner AP. 2009. Association of genetic variation in serum amyloid-A with cardiovascular disease and interactions with IL6, IL1RN, IL1beta and TNF genes in the Cardiovascular Health Study. J Atheroscler Thromb 16:419-430.

Conti RA, Solimene MC, da Luz PL, Benjo AM, Lemos Neto PA, Ramires JA. 2002. Comparison between young males and females with acute myocardial infarction. Arq Bras Cardiol 79:510-525.

Croce K, Libby P. 2007. Intertwining of thrombosis and inflammation in atherosclerosis. Curr Opin Hematol 14:55-61.

Dalgic N, Tekin D, Kayaalti Z, Soylemezoglu T, Cakir E, Kilic B, Kutlubay B, Sancar M, Odabasi M. 2011. Arg753Gln polymorphism of the human Toll-like receptor 2 gene from infection to disease in pediatric tuberculosis. Hum Immunol.

Damy SB, Higuchi ML, Timenetsky J, Reis MM, Palomino SP, Ikegami RN, Santos FP, Osaka JT, Figueiredo LP. 2009. Mycoplasma pneumoniae and/or Chlamydophila pneumoniae inoculation causing different aggravations in cholesterol-induced atherosclerosis in apoE KO male mice. BMC Microbiol 9:194.

de Winter RJ, Bholasingh R, Lijmer JG, Koster RW, Gorgels JP, Schouten Y, Hoek FJ, Sanders GT. 1999. Independent prognostic value of C-reactive protein and troponin I in patients with unstable angina or non-Q-wave myocardial infarction. Cardiovasc Res 42:240-245.

Deguchi JO, Aikawa M, Tung CH, Aikawa E, Kim DE, Ntziachristos V, Weissleder R, Libby P. 2006. Inflammation in atherosclerosis: visualizing matrix metalloproteinase action in macrophages in vivo. Circulation 114:55-62.

Dehus O, Bunk S, von Aulock S, Hermann C. 2008. IL-10 release requires stronger toll-like receptor 4-triggering than TNF: a possible explanation for the selective effects of heterozygous TLR4 polymorphism Asp(299)Gly on IL-10 release. Immunobiology 213:621-627.

den Dekker WK, Cheng C, Pasterkamp G, Duckers HJ. 2010. Toll like receptor 4 in atherosclerosis and plaque destabilization. Atherosclerosis 209:314-320.

Duzgun N, Duman T, Haydardedeoglu FE, Tutkak H. 2007. The lack of genetic association of the Toll-like receptor 2 (TLR2) Arg753Gln and Arg677Trp polymorphisms with rheumatic heart disease. Clin Rheumatol 26:915-919.

Edfeldt K, Bennet AM, Eriksson P, Frostegard J, Wiman B, Hamsten A, Hansson GK, de Faire U, Yan ZQ. 2004. Association of hypo-responsive toll-like receptor 4 variants with risk of myocardial infarction. Eur Heart J 25:1447-1453.

Elahi MM, Asotra K, Matata BM, Mastana SS. 2009. Tumor necrosis factor alpha -308 gene locus promoter polymorphism: an analysis of association with health and disease. Biochim Biophys Acta 1792:163-172.

Elkind MS, Sciacca R, Boden-Albala B, Rundek T, Paik MC, Sacco RL. 2006. Moderate alcohol consumption reduces risk of ischemic stroke: the Northern Manhattan Study. Stroke 37:13-19.

Eng HL, Chen CH, Kuo CC, Wu JS, Wang CH, Lin TM. 2003. Association of CD14 promoter gene polymorphism and Chlamydia pneumoniae infection. J Infect Dis 188:90-97.

Erridge C. 2010. Endogenous ligands of TLR2 and TLR4: agonists or assistants? J Leukoc Biol 87:989-999.

Ertan P, Berdeli A, Yilmaz O, Gonulal DA, Yuksel H. 2011. LY96, UPKIB Mutations and TLR4, CD14, MBL Polymorphisms in Children with Urinary Tract Infection. Indian J Pediatr.

Fabricant CG, Fabricant J, Litrenta MM, Minick CR. 1978. Virus-induced atherosclerosis. J Exp Med 148:335-340.

Fallavena PR, Borges TJ, Paskulin DD, Paludo FJ, Goetze TB, de Oliveira JR, Nobrega OT, Dias FS, Alho CS. 2009. The influences of CD14 -260C>T polymorphism on survival in ICU critically ill patients. Immunol Invest 38:797-811.

Fan H, Li L, Zhang X, Liu Y, Yang C, Yang Y, Yin J. 2009. Oxymatrine downregulates TLR4, TLR2, MyD88, and NF-kappaB and protects rat brains against focal ischemia. Mediators Inflamm 2009:704706.

Fernandez-Real JM, Broch M, Richart C, Vendrell J, Lopez-Bermejo A, Ricart W. 2003. CD14 monocyte receptor, involved in the inflammatory cascade, and insulin sensitivity. J Clin Endocrinol Metab 88:1780-1784.

Fong IW. 2009. New perspectives of infections in cardiovascular disease. Curr Cardiol Rev 5:87-104.

Frantz S, Ertl G, Bauersachs J. 2008. Toll-like receptor signaling in the ischemic heart. Front Biosci 13:5772-5779.

Fukushima R, Soejima H, Fukunaga T, Nakayama M, Oe Y, Oshima S, Sugiyama S, Ogawa H. 2009. Expression levels of Toll-like receptor genes in coronary atherosclerotic lesions of patients with acute coronary syndrome or stable angina pectoris. Circ J 73:1479-1484.

Ghaderian SM, Akbarzadeh Najar R, Tabatabaei Panah AS. 2010. Tumor necrosis factor-alpha: investigation of gene polymorphism and regulation of TACE-TNF-alpha system in patients with acute myocardial infarction. Mol Biol Rep.

Gieffers J, Fullgraf H, Jahn J, Klinger M, Dalhoff K, Katus HA, Solbach W, Maass M. 2001. Chlamydia pneumoniae infection in circulating human monocytes is refractory to antibiotic treatment. Circulation 103:351-356.

Gieffers J, van Zandbergen G, Rupp J, Sayk F, Kruger S, Ehlers S, Solbach W, Maass M. 2004. Phagocytes transmit Chlamydia pneumoniae from the lungs to the vasculature. Eur Respir J 23:506-510.

Gomez M, Valle V, Aros F, Sanz G, Sala J, Fiol M, Bruguera J, Elosua R, Molina L, Marti H, Covas MI, Rodriguez-Llorian A, Fito M, Suarez-Pinilla MA, Amezaga R, Marrugat J. 2009. Oxidized LDL, lipoprotein (a) and other emergent risk factors in acute myocardial infarction (FORTIAM study). Rev Esp Cardiol 62:373-382.

Goyal A, Mehta SR, Gerstein HC, Diaz R, Afzal R, Xavier D, Zhu J, Pais P, Lisheng L, Kazmi KA, Zubaid M, Piegas LS, Widimsky P, Budaj A, Avezum A, Yusuf S. 2009. Glucose levels compared with diabetes history in the risk assessment of patients with acute myocardial infarction. Am Heart J 157:763-770.

Gu Q, Yang XP, Bonde P, DiPaula A, Fox-Talbot K, Becker LC. 2006. Inhibition of TNF-alpha reduces myocardial injury and proinflammatory pathways following ischemia-reperfusion in the dog. J Cardiovasc Pharmacol 48:320-328.

Guech-Ongey M, Brenner H, Twardella D, Rothenbacher D. 2006. Chlamydia pneumoniae, heat shock proteins 60 and risk of secondary cardiovascular events in patients with coronary heart disease under special consideration of diabetes: a prospective study. BMC Cardiovasc Disord 6:17.

Halvorsen DS, Karlsen J, Noto AT, Mathiesen EB, Njolstad I, Gutteberg TJ, Vorland LH, Hansen JB. 2007. No detectable Chlamydia pneumoniae and cytomegalovirus DNA in leukocytes in subjects with echolucent and echogenic carotid artery plaques. Int J Cardiol 117:388-394.

Hamann L, Gomma A, Schroder NW, Stamme C, Glaeser C, Schulz S, Gross M, Anker SD, Fox K, Schumann RR. 2005. A frequent toll-like receptor (TLR)-2 polymorphism is a risk factor for coronary restenosis. J Mol Med 83:478-485.

Hansson GK. 2005. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. N Engl J Med 352:1685-1695.

Harcos P, Laki J, Kiszel P, Szeplaki Z, Szolnoki Z, Kovacs M, Melegh B, Szeplaki G, Fust G, Blasko B. 2006. Decreased frequency of the TNF2 allele of TNF-alpha -308 promoter polymorphism is associated with lacunar infarction. Cytokine 33:100-105.

Heidemann C, Boeing H, Pischon T, Nothlings U, Joost HG, Schulze MB. 2009. Association of a diabetes risk score with risk of myocardial infarction, stroke, specific types of cancer, and mortality: a prospective study in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam cohort. Eur J Epidemiol 24:281-288.

Higuchi-Dos-Santos MH, Pierri H, Higuchi Mde L, Nussbacher A, Palomino S, Sambiase NV, Ramires JA, Wajngarten M. 2005. [Chlamydia pneumoniae and Mycoplasma pneumoniae in calcified nodes of stenosed aortic valves.]. Arq Bras Cardiol 84:443-448.

Higuchi Mde L, Ramires JA. 2002. Infectious agents in coronary atheromas: a possible role in the pathogenesis of plaque rupture and acute myocardial infarction. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 44:217-224.

Higuchi ML, Sambiase N, Palomino S, Gutierrez P, Demarchi LM, Aiello VD, Ramires JA. 2000. Detection of Mycoplasma pneumoniae and Chlamydia pneumoniae in ruptured atherosclerotic plaques. Braz J Med Biol Res 33:1023-1026.

Hilden J, Lind I, Kolmos HJ, Als-Nielsen B, Damgaard M, Hansen JF, Hansen S, Helo OH, Hildebrandt P, Jensen GB, Kastrup J, Kjoller E, Nielsen H, Petersen L, Jespersen CM, Gluud C. 2010. Chlamydia pneumoniae IgG and IgA antibody titers and prognosis in patients with coronary heart disease: results from the CLARICOR trial. Diagn Microbiol Infect Dis 66:385-392.

Hogan RJ, Mathews SA, Mukhopadhyay S, Summersgill JT, Timms P. 2004. Chlamydial persistence: beyond the biphasic paradigm. Infect Immun 72:1843-1855.

Hoshida S, Nishino M, Tanouchi J, Kishimoto T, Yamada Y. 2005. Acute Chlamydia pneumoniae infection with heat-shock-protein-60-related response in patients with acute coronary syndrome. Atherosclerosis 183:109-112.

Hubacek JA, Rothe G, Pit'ha J, Skodova Z, Stanek V, Poledne R, Schmitz G. 1999. C(-260)-->T polymorphism in the promoter of the CD14 monocyte receptor gene as a risk factor for myocardial infarction. Circulation 99:3218-3220.

Hwang HJ, Ha JW, Joung B, Choi EH, Kim J, Ahn MS, Lee MH, Jang Y, Chung N, Kim SS. 2011. Relation of inflammation and left atrial remodeling in atrial fibrillation occurring in early phase of acute myocardial infarction. Int J Cardiol 146:28-31.

Ieven MM, Hoymans VY. 2005. Involvement of Chlamydia pneumoniae in atherosclerosis: more evidence for lack of evidence. J Clin Microbiol 43:19-24.

Into T, Dohkan J, Inomata M, Nakashima M, Shibata K, Matsushita K. 2007. Synthesis and characterization of a dipalmitoylated lipopeptide derived from paralogous lipoproteins of Mycoplasma pneumoniae. Infect Immun 75:2253-2259.

Iriz E, Cirak MY, Engin ED, Zor MH, Erer D, Imren Y, Turet S, Halit V. 2007. Effects of atypical pneumonia agents on progression of atherosclerosis and acute coronary syndrome. Acta Cardiol 62:593-598.

Ishii H, Yoshida M. 2011. [Platelets, coagulation, and fibrinolysis in atherosclerosis formation]. Nippon Rinsho 69:50-54.

Jha HC, Srivastava P, Sarkar R, Prasad J, Mittal AS. 2009. Association of plasma circulatory markers, Chlamydia pneumoniae, and high sensitive C-reactive protein in coronary artery disease patients of India. Mediators Inflamm 2009:561532.

Kablak-Ziembicka A, Przewlocki T, Sokolowski A, Tracz W, Podolec P. 2010. Carotid intima-media thickness, hs-CRP and TNF-alpha are independently associated with cardiovascular event risk in patients with atherosclerotic occlusive disease. Atherosclerosis.

Kahkonen S, Zvartau E, Lipsanen J, Bondarenko B. 2010. Effects of alcohol withdrawal on cardiovascular system. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.

Kaisho T, Akira S. 2006. Toll-like receptor function and signaling. J Allergy Clin Immunol 117:979-987; quiz 988.

Kang DG, Jeong MH, Ahn Y, Chae SC, Hur SH, Hong TJ, Kim YJ, Seong IW, Chae JK, Rhew JY, Chae IH, Cho MC, Bae JH, Rha SW, Kim CJ, Jang YS, Yoon J, Seung KB, Park SJ. 2009. Clinical effects of hypertension on the mortality of patients with acute myocardial infarction. J Korean Med Sci 24:800-806.

Kerimova EZ, Azizov VA, Mirzazade VA. 2010. [Risk of myocardial infarction in out-patient treatment of patients with type 2 diabetes]. Georgian Med News:41-45.

Keso T, Perola M, Laippala P, Ilveskoski E, Kunnas TA, Mikkelsson J, Penttila A, Hurme M, Karhunen PJ. 2001. Polymorphisms within the tumor necrosis factor locus and prevalence of coronary artery disease in middle-aged men. Atherosclerosis 154:691-697.

Kettunen T, Eklund C, Kahonen M, Jula A, Paiva H, Lyytikainen LP, Hurme M, Lehtimaki T. 2011. Polymorphism in the C-reactive protein (CRP) gene affects CRP levels in plasma and one early marker of atherosclerosis in men: The Health 2000 Survey. Scand J Clin Lab Invest.

Kiechl S, Lorenz E, Reindl M, Wiedermann CJ, Oberhollenzer F, Bonora E, Willeit J, Schwartz DA. 2002. Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis. N Engl J Med 347:185-192.

Kis Z, Sas K, Gyulai Z, Treso B, Petrovay F, Kapusinszky B, Csire M, Endresz V, Burian K, Mandi Y, Vecsei L, Gonczol E. 2007. Chronic infections and genetic factors in the development of ischemic stroke. New Microbiol 30:213-220.

Kolek MJ, Carlquist JF, Muhlestein JB, Whiting BM, Horne BD, Bair TL, Anderson JL. 2004. Toll-like receptor 4 gene Asp299Gly polymorphism is associated with reductions in vascular inflammation, angiographic coronary artery disease, and clinical diabetes. Am Heart J 148:1034-1040.

Kondo T, Ohno M, Shimokata K, Iino S, Inden Y, Murohara T, Hirai M. 2003. CD14 promoter polymorphism is associated with acute myocardial infarction resulting from insignificant coronary artery stenosis. Heart 89:931-932.

Kong SS, Liu JJ, Hwang TC, Yu XJ, Lu Y, Zang WJ. 2011. Roles of TNF-alpha and its receptors in the beneficial effects of vagal stimulation after myocardial infarction in rats. Clin Exp Pharmacol Physiol.

Kruger S, Graf J, Merx MW, Stickel T, Koch KC, Janssens U, Hanrath P, Kunz D. 2005. CD14 gene -260 C/T polymorphism is associated with chronic heart failure. Eur J Intern Med 16:345-347.

Kuo CC, Campbell LA. 2003. Chlamydial infections of the cardiovascular system. Front Biosci 8:e36-43.

Langsted A, Freiberg JJ, Tybjaerg-Hansen A, Schnohr P, Jensen GB, Nordestgaard BG. 2010. Nonfasting cholesterol and triglycerides and association with risk of myocardial infarction and total mortality: the Copenhagen City Heart Study with 31 years of follow-up. J Intern Med.

Libby P. 2002. Inflammation in atherosclerosis. Nature 420:868-874.

Libby P, Okamoto Y, Rocha VZ, Folco E. 2010. Inflammation in atherosclerosis: transition from theory to practice. Circ J 74:213-220.

Libby P, Ridker PM, Hansson GK. 2009. Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice. J Am Coll Cardiol 54:2129-2138.

Libby P, Theroux P. 2005. Pathophysiology of coronary artery disease. Circulation 111:3481-3488.

Lightwood JM, Glantz SA. 2009. Declines in acute myocardial infarction after smoke-free laws and individual risk attributable to secondhand smoke. Circulation 120:1373-1379.

Lin TM, Chen CH, Wu HL, Wang CH, Chen YL, Eng HL. 2008. The association of C (-260)-->T polymorphism in CD14 promoter and Chlamydia pneumoniae infection in ischemic stroke patients. Am J Clin Pathol 130:595-601.

Lindemann S, Kramer B, Seizer P, Gawaz M. 2007. Platelets, inflammation and atherosclerosis. J Thromb Haemost 5 Suppl 1:203-211.

Lindmark E, Diderholm E, Wallentin L, Siegbahn A. 2001. Relationship between interleukin 6 and mortality in patients with unstable coronary artery disease: effects of an early invasive or noninvasive strategy. JAMA 286:2107-2113.

Liu Z, Li JC, Shi YZ. 2009. [Expression of Toll like receptor 4 in peripheral-blood mononuclear cells of patients with acute cerebral infarction and its correlation with clinical subtypes and the severity of the disease]. Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi 25:816-818.

Lloyd-Jones D, Adams RJ, Brown TM, Carnethon M, Dai S, De Simone G, Ferguson TB, Ford E, Furie K, Gillespie C, Go A, Greenlund K, Haase N, Hailpern S, Ho PM, Howard V, Kissela B, Kittner S, Lackland D, Lisabeth L, Marelli A, McDermott MM, Meigs J, Mozaffarian D, Mussolino M, Nichol G, Roger VL, Rosamond W, Sacco R, Sorlie P, Stafford R, Thom T, Wasserthiel-Smoller S, Wong ND, Wylie-Rosett J. 2010. Executive summary: heart disease and stroke statistics--2010 update: a report from the American Heart Association. Circulation 121:948-954.

Lorenz E, Mira JP, Cornish KL, Arbour NC, Schwartz DA. 2000. A novel polymorphism in the toll-like receptor 2 gene and its potential association with staphylococcal infection. Infect Immun 68:6398-6401.

Lowe GD, Wood DA, Douglas JT, Riemersma RA, Macintyre CC, Takase T, Tuddenham EG, Forbes CD, Elton RA, Oliver MF. 1991. Relationships of plasma viscosity, coagulation and fibrinolysis to coronary risk factors and angina. Thromb Haemost 65:339-343.

Lucas DL, Brown RA, Wassef M, Giles TD. 2005. Alcohol and the cardiovascular system: research challenges and opportunities. J Am Coll Cardiol 45:1916-1924.

Magder LS, Klontz KC, Bush LH, Barnes RC. 1990. Effect of patient characteristics on performance of an enzyme immunoassay for detecting cervical Chlamydia trachomatis infection. J Clin Microbiol 28:781-784.

Maia IL, Nicolau JC, Machado Mde N, Maia LN, Takakura IT, Rocha PR, Cordeiro JA, Ramires JA. 2009. Prevalence of Chlamydia pneumoniae and Mycoplasma pneumoniae in different forms of coronary disease. Arq Bras Cardiol 92:405-411, 422-408, 439-445.

Maraha B, van Der Zee A, Bergmans AM, Pan M, Peeters MF, Berg HF, Scheffer GJ, Kluytmans JA. 2000. Is Mycoplasma pneumoniae associated with vascular disease? J Clin Microbiol 38:935-936.

Merry AH, Boer JM, Schouten LJ, Feskens EJ, Verschuren WM, Gorgels AP, van den Brandt PA. 2011. Smoking, alcohol consumption, physical activity, and family history and the risks of acute myocardial infarction and unstable angina pectoris: a prospective cohort study. BMC Cardiovasc Disord 11:13.

Minhas K, Micheal S, Ahmed F, Ahmed A. 2010. Strong association between the -308 TNF promoter polymorphism and allergic rhinitis in Pakistani patients. J Investig Allergol Clin Immunol 20:563-566.

Momiyama Y, Ohmori R, Taniguchi H, Nakamura H, Ohsuzu F. 2004. Association of Mycoplasma pneumoniae infection with coronary artery disease and its interaction with chlamydial infection. Atherosclerosis 176:139-144.

Morange PE, Saut N, Alessi MC, Frere C, Hawe E, Yudkin JS, Tremoli E, Margaglione M, Di Minno G, Hamsten A, Humphries SE, Juhan-Vague I. 2005. Interaction between the C-260T polymorphism of the CD14 gene and the plasma IL-6 concentration on the risk of myocardial infarction: the HIFMECH study. Atherosclerosis 179:317-323.

Muller J, Holm C, Nyvad O, Larsen NA, Pedersen EB. 2004. Repetitive measurements of Chlamydia pneumoniae DNA in peripheral blood mononuclear cells in healthy control subjects and dialysis patients: a prospective study. Scand J Infect Dis 36:718-723.

Natori H, Koga T, Fujimoto K, Taguchi J, Kamimura T, Nishimura M. 2010. Organizing pneumonia associated with Mycoplasma pneumoniae infection. Jpn J Radiol 28:688-691.

Nauck M, Winkelmann BR, Hoffmann MM, Bohm BO, Wieland H, Marz W. 2002. C(-260)T polymorphism in the promoter of the CD14 gene is not associated with coronary artery disease and myocardial infarction in the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health (LURIC) study. Am J Cardiol 90:1249-1252.

Nebel A, Flachsbart F, Schafer A, Nothnagel M, Nikolaus S, Mokhtari NE, Schreiber S. 2007. Role of the toll-like receptor 4 polymorphism Asp299Gly in longevity and myocardial infarction in German men. Mech Ageing Dev 128:409-411.

Nilsson PM, Cederholm J, Eeg-Olofsson K, Eliasson B, Zethelius B, Fagard R, Gudbjornsdottir S. 2009. Smoking as an independent risk factor for myocardial infarction or stroke in type 2 diabetes: a report from the Swedish National Diabetes Register. Eur J Cardiovasc Prev Rehabil 16:506-512.

Nishiyama S, Watanabe T, Arimoto T, Takahashi H, Shishido T, Miyashita T, Miyamoto T, Nitobe J, Shibata Y, Konta T, Kawata S, Kato T, Fukao A, Kubota I. 2010. Trends in coronary risk factors among patients with acute myocardial infarction over the last decade: the Yamagata AMI registry. J Atheroscler Thromb 17:989-998.

Nordestgaard BG, Zacho J. 2009. Lipids, atherosclerosis and CVD risk: is CRP an innocent bystander? Nutr Metab Cardiovasc Dis 19:521-524.

Nystrom-Rosander C, Edvinsson M, Thelin S, Hjelm E, Friman G. 2006. Chlamydophila pneumonia: Specific mRNA in aorta ascendens in patients undergoing coronary artery by-pass grafting. Scand J Infect Dis 38:758-763.

Ogus AC, Yoldas B, Ozdemir T, Uguz A, Olcen S, Keser I, Coskun M, Cilli A, Yegin O. 2004. The Arg753GLn polymorphism of the human toll-like receptor 2 gene in tuberculosis disease. Eur Respir J 23:219-223.

Ouburg S, Spaargaren J, den Hartog JE, Land JA, Fennema JS, Pleijster J, Pena AS, Morre SA. 2005. The CD14 functional gene polymorphism -260 C>T is not involved in either the susceptibility to Chlamydia trachomatis infection or the development of tubal pathology. BMC Infect Dis 5:114.

Palikhe A, Lokki ML, Saikku P, Leinonen M, Paldanius M, Seppanen M, Valtonen V, Nieminen MS, Sinisalo J. 2008. Association of Chlamydia pneumoniae infection with HLA-B*35 in patients with coronary artery disease. Clin Vaccine Immunol 15:55-59.

Palikhe A, Tiirola T, Puolakkainen M, Nieminen MS, Saikku P, Leinonen M, Sinisalo J. 2009. Chlamydia pneumoniae DNA is present in peripheral blood mononuclear cells during acute coronary syndrome and correlates with chlamydial lipopolysaccharide levels in serum. Scand J Infect Dis 41:201-205.

Pickens S, Catterall JR. 1978. Disseminated intravascular coagulation and myocarditis associated with Mycoplasma pneumoniae infection. Br Med J 1:1526.

Pietila K, Harmoinen A, Hermens W, Simoons ML, Van de Werf F, Verstraete M. 1993. Serum C-reactive protein and infarct size in myocardial infarct patients with a closed versus an open infarct-related coronary artery after thrombolytic therapy. Eur Heart J 14:915-919.

Piro M, Della Bona R, Abbate A, Biasucci LM, Crea F. 2010. Sex-related differences in myocardial remodeling. J Am Coll Cardiol 55:1057-1065.

Poikonen K, Lajunen T, Silvennoinen-Kassinen S, Leinonen M, Saikku P. 2009. Effects of CD14, TLR2, TLR4, LPB, and IL-6 gene polymorphisms on Chlamydia pneumoniae growth in human macrophages in vitro. Scand J Immunol 70:34-39.

Post F, Munzel T. 2010. [Acute coronary syndrome : A diffuse diagnosis.]. Internist (Berl).

Rassu M, Lauro FM, Cazzavillan S, Bonoldi E, Belloni M, Bettini MC, Pilotto A, Mengoli C, Peron A, Zambello R, Scagnelli M, Bertoloni G. 2001. Detection of Chlamydophila pneumoniae DNA in peripheral blood mononuclear cells of blood donors in the north-east of Italy. Med Microbiol Immunol 190:139-144.

Riikola A, Sipila K, Kahonen M, Jula A, Nieminen MS, Moilanen L, Kesaniemi YA, Lehtimaki T, Hulkkonen J. 2009. Interleukin-6 promoter polymorphism and cardiovascular risk factors: the Health 2000 Survey. Atherosclerosis 207:466-470.

Rizzello V, Liuzzo G, Trabetti E, Di Giannuario G, Brugaletta S, Santamaria M, Piro M, Boccanelli A, Pignatti PF, Biasucci LM, Crea F. 2010. Role of the CD14 C(-260)T promoter polymorphism in determining the first clinical manifestation of coronary artery disease. J Cardiovasc Med (Hagerstown) 11:20-25.

Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA, Bazan JF. 1998. A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. Proc Natl Acad Sci U S A 95:588-593.

Romano Carratelli C, Mazzola N, Paolillo R, Sorrentino S, Rizzo A. 2009. Toll-like receptor-4 (TLR4) mediates human beta-defensin-2 (HBD-2) induction in response to Chlamydia pneumoniae in mononuclear cells. FEMS Immunol Med Microbiol 57:116-124.

Rosso R, Roth A, Herz I, Miller H, Keren G, George J. 2005. Serum levels of interleukin-18 in patients with stable and unstable angina pectoris. Int J Cardiol 98:45-48.

Sakurai-Komada N, K AK, Kaku Y, Hiraki M, Cui R, Sankai T, Kikuchi S, Date C, Tamakoshi A, Iso H. 2010. Chlamydia pneumoniae Infection was Associated with Risk of Mortality from Coronary Heart Disease in Japanese Women but not Men: the JACC Study. J Atheroscler Thromb.

Sanchez-Escuredo A, Pastor MC, Bayes B, Morales-Indiano C, Troya M, Dolade M, Jimenez JA, Romero R, Lauzurica R. 2010. Inflammation, metalloproteinases, and growth factors in the development of carotid atherosclerosis in renal transplant patients. Transplant Proc 42:2905-2907.

Sanchez E, Orozco G, Lopez-Nevot MA, Jimenez-Alonso J, Martin J. 2004. Polymorphisms of toll-like receptor 2 and 4 genes in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. Tissue Antigens 63:54-57.

Sanjuan R, Blasco ML, Martinez-Maicas H, Carbonell N, Minana G, Nunez J, Bodi V, Sanchis J. 2011. Acute Myocardial Infarction: High Risk Ventricular Tachyarrhythmias and Admission Glucose Level in Patients with and without Diabetes Mellitus. Curr Diabetes Rev 7:126-134.

Sasaki J, Kita T, Mabuchi H, Matsuzaki M, Matsuzawa Y, Nakaya N, Oikawa S, Saito Y, Shimamoto K, Kono S, Itakura H. 2006. Gender difference in coronary events in relation to risk factors in Japanese hypercholesterolemic patients treated with low-dose simvastatin. Circ J 70:810-814.

Sbarsi I, Falcone C, Boiocchi C, Campo I, Zorzetto M, De Silvestri A, Cuccia M. 2007. Inflammation and atherosclerosis: the role of TNF and TNF receptors polymorphisms in coronary artery disease. Int J Immunopathol Pharmacol 20:145-154.

Schrijvers DM, De Meyer GR, Herman AG, Martinet W. 2007. Phagocytosis in atherosclerosis: Molecular mechanisms and implications for plaque progression and stability. Cardiovasc Res 73:470-480.

Schroder NW, Schumann RR. 2005. Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptors and susceptibility to infectious disease. Lancet Infect Dis 5:156-164.

Sessa R, Di Pietro M, Schiavoni G, Petrucca A, Cipriani P, Zagaglia C, Nicoletti M, Santino I, del Piano M. 2007. Measurement of Chlamydia pneumoniae bacterial load in peripheral blood mononuclear cells may be helpful to assess the state of chlamydial infection in patients with carotid atherosclerotic disease. Atherosclerosis 195:e224-230.

Sezer M, Umman S. 2008. [Role of leucocytes in microvascular malperfusion in reperfused acute myocardial infarction]. Anadolu Kardiyol Derg 8:48-50.

Shekelle RB, Shryock AM, Paul O, Lepper M, Stamler J, Liu S, Raynor WJ, Jr. 1981. Diet, serum cholesterol, and death from coronary heart disease. The Western Electric study. N Engl J Med 304:65-70.

Shevchenko AV, Golovanova OV, Konenkov VI, Tolkacheva OM, Romashchenko AG, Maksimov VN, Voevoda MI. 2010. [Analysis of polymorphism of three positions of promoter region of TNF- gene in patients with ischemic heart disease, unstable angina and myocardial infarction]. Kardiologiia 50:9-14.

Smieja M, Chong S, Natarajan M, Petrich A, Rainen L, Mahony JB. 2001. Circulating nucleic acids of Chlamydia pneumoniae and cytomegalovirus in patients undergoing coronary angiography. J Clin Microbiol 39:596-600.

Smith LG. 2010. Mycoplasma pneumonia and its complications. Infect Dis Clin North Am 24:57-60.

Sposito AC, Caramelli B, Fonseca FA, Bertolami MC, Afiune Neto A, Souza AD, Lottenberg AM, Chacra AP, Faludi AA, Loures-Vale AA, Carvalho AC, Duncan B, Gelonese B, Polanczyk C, Rodrigues Sobrinho CR, Scherr C, Karla C, Armaganijan D, Moriguchi E, Saraiva F, Pichetti G, Xavier HT, Chaves H, Borges JL, Diament J, Guimaraes JI, Nicolau JC, dos Santos JE, de Lima JJ, Vieira JL, Novazzi JP, Faria Neto JR, Torres KP, Pinto Lde A, Bricarello L, Bodanese LC, Introcaso L, Malachias MV, Izar MC, Magalhaes ME, Schmidt MI, Scartezini M, Nobre M, Foppa M, Forti NA, Berwanger O, Gebara OC, Coelho OR, Maranhao RC, dos Santos RD, Costa RP, Barreto S, Kaiser S, Ihara S, Carvalho T, Martinez TL, Relvas WG, Salgado W. 2007. [IV Brazilian Guideline for Dyslipidemia and Atherosclerosis prevention: Department of Atherosclerosis of Brazilian Society of Cardiology]. Arq Bras Cardiol 88 Suppl 1:2-19.

Stelter F. 2000. Structure/function relationships of CD14. Chem Immunol 74:25-41.

Strunz CM, Araki LM, Nogueira AA, Mansur AP. 2011. Gender differences in serum CK-MB mass levels in healthy Braziliansubjects. Braz J Med Biol Res 44:236-239.

Takeda K. 2010. The lipid a receptor. Adv Exp Med Biol 667:53-58.

Takeda K, Akira S. 2005. Toll-like receptors in innate immunity. Int Immunol 17:1-14.

Takeda K, Akira S. 2007. Toll-like receptors. Curr Protoc Immunol Chapter 14:Unit 14 12.

Templeton KE, Scheltinga SA, Graffelman AW, Van Schie JM, Crielaard JW, Sillekens P, Van Den Broek PJ, Goossens H, Beersma MF, Claas EC. 2003. Comparison and evaluation of real-time PCR, real-time nucleic acid sequence-based amplification, conventional PCR, and serology for diagnosis of Mycoplasma pneumoniae. J Clin Microbiol 41:4366-4371.

Terry CF, Loukaci V, Green FR. 2000. Cooperative influence of genetic polymorphisms on interleukin 6 transcriptional regulation. J Biol Chem 275:18138-18144.

Tiong AY, Brieger D. 2005. Inflammation and coronary artery disease. Am Heart J 150:11-18.

Tolstrup J, Jensen MK, Tjonneland A, Overvad K, Mukamal KJ, Gronbaek M. 2006. Prospective study of alcohol drinking patterns and coronary heart disease in women and men. BMJ 332:1244-1248.

Tosetto A, Prati P, Baracchini C, Manara R, Rodeghiero F. 2011. Association of plasma fibrinogen, C-reactive protein and G-455>A polymorphism with early atherosclerosis in the VITA Project cohort. Thromb Haemost 105:329-335.

Tsezou A, Poultsides L, Kostopoulou F, Zintzaras E, Satra M, Kitsiou-Tzeli S, Malizos KN. 2008. Influence of interleukin 1alpha (IL-1alpha), IL-4, and IL-6 polymorphisms on genetic susceptibility to chronic osteomyelitis. Clin Vaccine Immunol 15:1888-1890.

Tsung A, McCoy SL, Klune JR, Geller DA, Billiar TR, Hefeneider SH. 2007. A novel inhibitory peptide of Toll-like receptor signaling limits lipopolysaccharide-induced production of inflammatory mediators and enhances survival in mice. Shock 27:364-369.

Unal S, Gumruk F, Aytac S, Yalnzoglu D, Gurgey A. 2008. Interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) levels and IL-6, TNF-polymorphisms in children with thrombosis. J Pediatr Hematol Oncol 30:26-31.

van der Graaf C, Kullberg BJ, Joosten L, Verver-Jansen T, Jacobs L, Van der Meer JW, Netea MG. 2005. Functional consequences of the Asp299Gly Toll-like receptor-4 polymorphism. Cytokine 30:264-268.

Villalbi JR, Castillo A, Cleries M, Salto E, Sanchez E, Martinez R, Tresserras R, Vela E. 2009. Acute myocardial infarction hospitalization statistics: apparent decline accompanying an increase in smoke-free areas. Rev Esp Cardiol 62:812-815.

Waites KB, Talkington DF. 2004. Mycoplasma pneumoniae and its role as a human pathogen. Clin Microbiol Rev 17:697-728, table of contents.

Wang PY, Kitchens RL, Munford RS. 1995. Bacterial lipopolysaccharide binds to CD14 in low-density domains of the monocyte-macrophage plasma membrane. J Inflamm 47:126-137.

Watson C, Alp NJ. 2008. Role of Chlamydia pneumoniae in atherosclerosis. Clin Sci (Lond) 114:509-531.

West SK, Kohlhepp SJ, Jin R, Gleaves CA, Stamm W, Gilbert DN. 2009. Detection of circulating Chlamydophila pneumoniae in patients with coronary artery disease and healthy control subjects. Clin Infect Dis 48:560-567.

Xu AJ, Liu XL, Guo JZ, Xia Z. 2010. [Polymorphism of bovine TNF-a gene and its association with mastitis in Chinese Holstein cows]. Yi Chuan 32:929-934.

Yang QW, Li JC, Lu FL, Wen AQ, Xiang J, Zhang LL, Huang ZY, Wang JZ. 2008. Upregulated expression of toll-like receptor 4 in monocytes correlates with severity of acute cerebral infarction. J Cereb Blood Flow Metab 28:1588-1596.

Yeghiazarians Y, Braunstein JB, Askari A, Stone PH. 2000. Unstable angina pectoris. N Engl J Med 342:101-114.

Yilmaz G, Surer H, Inan LE, Coskun O, Yucel D. 2007. Increased nitrosative and oxidative stress in platelets of migraine patients. Tohoku J Exp Med 211:23-30.

Yin X, Hou T, Liu Y, Chen J, Yao Z, Ma C, Yang L, Wei L. 2010. Association of Toll-like receptor 4 gene polymorphism and expression with urinary tract infection types in adults. PLoS One 5:e14223.

You XX, Zeng YH, Wu YM. 2006. Interactions between mycoplasma lipid-associated membrane proteins and the host cells. J Zhejiang Univ Sci B 7:342-350.

Zee RY, Lindpaintner K, Struk B, Hennekens CH, Ridker PM. 2001. A prospective evaluation of the CD14 C(-260)T gene polymorphism and the risk of myocardial infarction. Atherosclerosis 154:699-702.

Zeng M, Wen Y, Liu LY, Wang H, Guan KP, Huang X. 2009. Role of TNF-alpha, sTNF-R55 and sTNF-R75 in Inflammation of Acute Exacerbations of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Respiration 78:399-403.

Zhang L, Zalewski A, Liu Y, Mazurek T, Cowan S, Martin JL, Hofmann SM, Vlassara H, Shi Y. 2003. Diabetes-induced oxidative stress and low-grade inflammation in porcine coronary arteries. Circulation 108:472-478.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

Ofício CEP nº 76/2006

São Paulo, 26 de maio de 2006.

Ilmo(a). Sr(a).
Prof. Dr. Mário Hiroyuki Hirata
FBC

Prezado(a) Senhor(a),

Vimos informar que em face da delegação atribuída pelo Inciso VI.5 da Resolução 340 de 8/7/04 o Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião realizada em 22 de maio de 2005, **APROVOU** o projeto "Estudo da expressão gênica e da influencia de polimorfismos do gene TLR2 e 4 na Síndrome coronariana aguda associada à infecção" (Protocolo CEP nº 371) apresentado por vossa senhoria e, consoante o mesmo dispositivo encaminhamos à CONEP a Folha de Rosto e o Parecer Consubstanciado.

Lembramos que após a execução de 50% do cronograma do projeto, deverá ser apresentado um relatório parcial, de acordo com o Artigo 18 – item C, da Portaria FCF-111/97.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Valentina Porta
Coordenadora do Comitê de Ética
em Pesquisa da FCF/USP

Av. Prof. Lineu Prestes, nº 580, Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone / Fax: (11) 3091-3677 - e-mail: cepfcf@usp.br