

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CLÍNICA MÉDICA**

LUCIELE SEHNEM

ANTICORPOS CONTRA *Chlamydia trachomatis* E SÍNDROME METABÓLICA

PORTO ALEGRE

2010

LUCIELE SEHNEM

ANTICORPOS CONTRA *Chlamydia trachomatis* E SÍNDROME METABÓLICA

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do Grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS).

Orientador

Prof. Dr.HENRIQUE LUIZ STAUB

PORTO ALEGRE

2010

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)**S456a Sehnem, Luciele****Anticorpos contra Chlamydia trachomatis e síndrome metabólica /
Luciele Sehnem. Porto Alegre: PUCRS, 2010.****115 p.: il. gráf. tab. Inclui um artigo de periódico.****Orientador: Prof. Dr. Henrique Luiz Staub.****Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica. Área de concentração: Clínica Médica.****1. SÍNDROME X METABÓLICA. 2. ATEROSCLEROSE. 3. DOENÇAS CARDIOVASCULARES. 4. FATORES DE RISCO. 5. CHLAMYDIA TRACHOMATIS. 6. IMUNOGLUBULINA A. 7. IMUNOGLUBULINA G. 8. ANTICORPOS. 9.****ESTUDOS TRANSVERSAIS. I. Staub, Henrique Luiz. II. Título.****C.D.D. 618.34****C.D.U. 616.39:616.1 (043.3)****N.L.M. WK 820**

LUCIELE SEHNEM

ANTICORPOS CONTRA *Chlamydia trachomatis* E SÍNDROME METABÓLICA

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do Grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS).

Aprovado em 04 de março de 2010

BANCA EXAMINADORA

Dr. Jorge André Horta – UNISC

Dra. Myriam Fortes Perrenoud – HSL/PUCRS

Dr. João Carlos Vieira da Costa Guaragna – HSL/PUCRS

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, **Professor Dr. Henrique Luiz Staub**, pela contribuição inestimável para a realização deste trabalho, por ter me concedido a oportunidade de trabalhar sob sua orientação; e por proporcionar o meu amadurecimento profissional e, também, pessoal.

Toda a equipe do **Laboratório de Patologia do Hospital São Lucas da PUCRS**; em especial a Dr. Myriam Fortes Perrenoud, Adriana Alves, Adroaldo Lunardelli e Fernanda Borges pela grande colaboração para realizar este trabalho.

A empresa **ALKA[®] – Tecnologia em Diagnóstico**, pela colaboração nos testes sorológicos.

Ao **Professor Dr. Luis Carlos Bodanese**, pelo incentivo e apoio durante a realização da pesquisa.

A todo o serviço e orientadores do **Ambulatório de Risco Cardiometabólico do Hospital São Lucas da PUCRS**, pelo apoio e Colaboração.

À **PUCRS**, em especial ao **Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde**, pela oportunidade de realizar o curso de Mestrado e pela infra-estrutura.

Ao **Professor Dr. Mário Wagner** pelo trabalho estatístico.

Aos **colegas do curso de Mestrado** pelo apoio e cumplicidade nestes dois anos de estudos, em especial a **Rosecler**, pela parceria na realização deste trabalho.

Agradeço ao meu **pai Guilherme**, pela confiança, patrocínio e por sempre respeitar as minhas decisões.

Meus tios **Norberto e Dirce**, pelo grande apoio e companhia agradável nestes dois anos de curso.

E a todos os **mestres, amigos e familiares** que contribuíram para a minha evolução pessoal.

Muito Obrigada!

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1. Diagnóstico da Síndrome Metabólica de acordo com diferentes grupos	13
Figura 1. Placa de ateroma totalmente formado	19
Quadro 2. Doenças humanas causadas por <i>Chlamydia trachomatis</i>	23
Figura 2. Ciclo celular da <i>Chlamydia</i>	25

LISTA DE TABELAS DO ARTIGO

Tabela 1. Dados demográficos da amostra.....	50
Tabela 2. Associação entre anticorpos IgA e IgG anti-CT e SM.	51
Tabela 3. Prevalência de anticorpos IgA e IgG anti-CT em indivíduos com SM (com e sem eventos cardíacos) e controles.	51
Tabela 4. Odds ratios ajustados para IgA e IgG anti-CT nos diferentes grupos	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

I-DBSM	I Diretrizes Brasileira de Prevenção e Tratamento da Síndrome Metabólica
AACE	American Association of Clinical Endocrinologists
AHA/NHLBI	American Heart Association/National Heart, Lung and Blood Institute
ATP	Trifosfato de adenosina
beta2-gpI	Beta2-glicoproteína I
CAM	Moléculas de adesão celular
CDC	Center for Disease Control and Prevention
CEP	Comitê de ética em pesquisa
CT	<i>Chlamydia trachomatis</i>
DCV	Doença cardiovascular
DM	Diabete mellitus
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
DST	Doença sexualmente transmissível
EGIR	European Group for the Study of Insuline Resistance
ELISA	Testagem imunoenzimática - ensaio detector de anticorpos de enzimas
EUA	Estados Unidos da América
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
Hbc	Antígeno do núcleo da hepatite B
HbsAg	Antígeno de superfície da hepatite B
HCV	Vírus da Hepatite C
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HSL	Hospital São Lucas
Hsp	Proteína de choque térmico
HTLV	Vírus T-linfotrópico humano

IC	Intervalo de confiança
ICAM	Moléculas de adesão endotelial intracelular
IDF	International Diabetes Federation
IFN-γ	Interferon - gama
IgA	Imunoglobulina A ou anticorpo de fase aguda
IgG	Imunoglobulina G ou anticorpo de memória
IL	Interleucina
ILIB A	Grupo Latino Americano da Oficina Internacional de Informação em Lípides
IMC	Índice de massa corporal
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDL-ox	Lipoproteína de baixa densidade oxidado
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MOMP	Principal proteína externa da membrana
n/N	Número amostral
NCEP ATP III	National Cholesterol Education Programme Adult Treatment Panel III
OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	Odds ratio
PAI-1	Ativador de plasminogênio-1
PCR	Proteína C reativa
PUCRS	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
RI	Resistência a insulina
SAA	Proteína amilóide sérica
SM	Síndrome metabólica
SMcE	Síndrome metabólica com evento cardíaco
SMsE	Síndrome metabólica sem evento cardíaco
SPSS	Statistical package for the social sciences
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TRI	Triglicerídeos
VCAM	Moléculas de adesão endotelial vascular
VDRL	Venereal Disease Research Laboratory

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	graus Celsius
α	alfa
γ	gama
μL	microlitro
cm	centímetros
kDa	kilodaltons
Kg/m²	quilograma por metro quadrado
mg/dL	miligramas por decilitro
mL	mililitro
mmHg	milímetros de mercúrio
nm	nanômetro

SUMÁRIO

1	REFERENCIAL TEÓRICO	11
1.1	Síndrome Metabólica	11
1.1.1	Fisiopatologia da Síndrome Metabólica.....	14
1.1.1.1	Papel endócrino e inflamatório do tecido adiposo	15
1.2	Aterosclerose e Inflamação.....	18
1.3	<i>Chlamydia trachomatis</i>	21
1.3.1	Patogenia	24
1.3.2	<i>Chlamydia</i> e aterosclerose	27
2	JUSTIFICATIVA.....	29
3	HIPÓTESES.....	30
3.1	Hipótese Operacional	30
3.2	Hipótese Conceitual	30
4	OBJETIVO.....	31
	REFERÊNCIAS.....	32
5	ARTIGO EM PORTUGUÊS.....	43
6	ARTIGO EM INGLÊS	66
	ANEXO A - Termo de consentimento livre e esclarecido.....	89
	ANEXO B - Carta de aprovação do comitê de ética em pesquisa da PUCRS	91
	ANEXO C - Cópia do artigo submetido ao Journal of Biomedical Science – 1021-7770	92
	ANEXO D - Comprovantes de submissão do artigo ao Journal of Biomedical Science	114

1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 Síndrome metabólica

A síndrome metabólica (SM) ocupa um considerável espaço na literatura médica. A SM representa um conjunto de anormalidades metabólicas e hemodinâmicas, atrelada ao desenvolvimento de dislipidemias, hipertensão arterial, obesidade, diabetes mellitus tipo 2 (DM2) e doenças cardiovasculares (DCV). Associados ao desenvolvimento da SM estão os inadequados hábitos de vida, como o sedentarismo e uma má alimentação, predisposição genética e ainda o aumento da expectativa de vida¹⁻³.

Em 1988, Raven introduziu o conceito de síndrome X para descrever o conjunto de anormalidades, mas a síndrome foi descrita pela primeira vez em 1922 e desde então surgiram diversos nomes para caracterizá-la como: quarteto mortal, síndrome X, síndrome metabólica hipertensiva, síndrome plurimetabólica e síndrome de resistência a insulina, mas a maioria dos trabalhos atuais tem adotado o termo síndrome metabólica^{1,4,5}.

A SM é um grupo de desordens metabólicas que compõe um conjunto de fatores de risco para aterosclerose, disfunção endotelial e ativação do sistema de coagulação que podem levar a eventos cardiovasculares⁶. Nestas desordens metabólicas inclui-se a obesidade abdominal, intolerância à glicose/resistência a insulina/hiperinsulinemia, hipertensão arterial sistêmica (HAS), dislipidemia aterogênica [aumento dos triglicerídeos (TRI) e baixos níveis da lipoproteína de alta densidade (HDL)]⁷.

Além desses critérios utilizados para o diagnóstico da SM, outras alterações metabólicas podem estar presentes, tais como a diminuição do tamanho das partículas de lipoproteína de baixa densidade (LDL), microalbuminúria, síndrome do ovário policístico, hiperuricemia, hiperhomocisteinemia e diminuição de adiponectina^{8,9}. Indivíduos com essas características geralmente manifestam um estado pró-trombótico [elevação nas concentrações do fibrinogênio e aumento do inibidor do ativador de plasminogênio-1 (PAI-1)] e pró-inflamatório [aumento das citocinas: fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina (IL)-6 e aumento da proteína C-reativa (PCR)]^{10,11}.

A prevalência da SM está estimada entre 20 e 25% da população geral¹. Estudos nas populações, mexicana, norte-americana e asiática, revelam uma diferença na prevalência, variando de 12 a 28% em homens e de 11 a 41% em mulheres¹². Na população americana

estima-se que 24% dos adultos tenham SM e distribuídos conforme a faixa etária em, 7% na dos 20 - 29 anos, 44% dos 60 - 65 anos e 42% nos indivíduos acima de 69 anos¹³.

Os dados de prevalência da SM são muito preocupantes, já que a SM é preditora de diabetes mellitus (DM) e DCV; indivíduos com SM tem risco de 2 a 3 vezes maior de desenvolver morbidades cardiovasculares. De uma maneira geral a prevalência da SM vem aumentando e está associada com a epidemia de obesidade e DM¹.

Vários são os critérios de diagnósticos empregados nos estudos publicados sobre a SM, porém, ainda não há um consenso entre eles, sendo os fatores de risco (componentes adotados para a sua definição) praticamente os mesmos.

Os principais critérios de diagnóstico propostos atualmente por alguns países são os definidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 1998¹⁴, pelo *European Group for the Study of Insuline Resistance* (EGIR) em 1999¹⁵, pelo *National Cholesterol Education Programme Adult Treatment Panel III* (NCEP ATP III) em 2001¹⁶, pelo *Grupo Latino Americano da Oficina Internacional de Informação em Lípides* (ILIB A) em 2002¹⁷, pelo *American Association of Clinical Endocrinologists* (AACE) em 2005¹⁸, pelo *International Diabetes Federation* (IDF) em 2005¹⁹ e pela *American Heart Association/National Heart, Lung and Blood Institute* (AHA/NHLBI) em 2005¹¹. Em 2004 foi feita a padronização de uma definição direcionada a população brasileira pela I Diretrizes Brasileira de Prevenção e Tratamento da Síndrome Metabólica (I-DBSM)¹².

Apesar de haver características comuns entre as definições, existem parâmetros específicos em que elas diferem. As classificações da OMS e da EGIR exigem a medida da resistência à insulina (RI) pelo teste oral de tolerância a glicose ou hiperglicemia de jejum. A NCEP ATP III não possui um critério de diagnóstico obrigatório e foi utilizado para a elaboração de outras definições, como no IDF, na AHA/NHLBI e I-DBSM. A classificação da IDF e ILIB A apresentam a obesidade central como um critério de diagnóstico, enquanto que a AACE não inclui esta medida para o diagnóstico²⁰. As características para o diagnóstico da SM dos principais grupos estão resumidas no **quadro 1**.

Grupos	OMS	EGIR	NCEP	I-DBSM	AACE	IDF
Diagnóstico de SM firmado por:	RI e + 2 fatores	RI e + 2 fatores	Presença de 3 ou mais fatores	Ter 3 dos 5 fatores	Indica fatores de risco	Alteração abdominal e + 2 fatores
HAS em mmHg	≥140/90	≥140/90	≥130/85	≥130/85	≥130/85	≥130/85
TRI em mg/dL	≥150	≥150	≥150	≥150	≥150	≥150
HDL em mg/dL	<35 para homens e <39 para mulheres	<39	<40 para homens e <50 para mulheres	<40 para homens e <50 para mulheres	<40 para homens e <50 para mulheres	<40 para homens e <50 para mulheres
Obesidade central	Cintura/quadril >0,90 para homens e >0,85 para mulheres e IMC >30kg/m ²	Cintura ≥94 cm para homens e ≥80 cm para mulheres	Cintura ≥102 cm para homens e ≥88 cm para mulheres	Cintura >102 cm para homens e >88 cm para mulheres	IMC ≥25 kg/m ²	Variação conforme a etnia
Glicose sérica em mg/dL	≥110 ou tolerância após 2h ≥140	≥110 ou tolerância após 2h ≥140	>110	≥100 ou DM	Glicemia de jejum alterada ou ter tolerância	≥100 ou DM

Quadro 1. Diagnóstico da Síndrome Metabólica de acordo com diferentes grupos.

Fonte: Scott, M; et al. Diagnosis and Management of the Metabolic Syndrome. An American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation* Oct 2005.

IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. *Arq Bras Cardiol.* v. 88, Supl I, Abr 2007.

RI: resistência à insulina, IMC: índice de massa corporal.

As diferenças nestas definições para a SM são baseadas nas controvérsias dos mecanismos fisiopatológicos, que incluem um aumento da gordura visceral e RI. Portanto algumas tentativas para identificar uma chave para o mecanismo fisiopatológico da SM é impedido pela complexa combinação dos mecanismos²¹.

1.1.1 Fisiopatologia da síndrome metabólica

A etiologia da SM não está bem estabelecida, pois uma proposta sugere que a causa primária da SM é a resistência a insulina (RI), que por sua vez está correlacionada com a obesidade abdominal/central/visceral; mas outra proposta sugere que mudanças hormonais são responsáveis pelo desenvolvimento da obesidade²².

Eventos iniciais que provocam as alterações observadas na SM parecem estar ligados ao aumento do consumo calórico, aumento do tecido adiposo visceral e de ácidos graxos livres, capaz de desencadear o início da RI²³.

Com o aumento do consumo calórico, os ácidos graxos são armazenados e, ultrapassando seus limites, não conseguem mais entrar nas células adiposas promovendo uma RI que na tentativa de forçar a entrada de mais ácidos graxos. Quando isso ocorre, ácidos graxos acumulam-se no sangue e para controlar a RI e levar os ácidos graxos para as células de gordura, o pâncreas produz mais insulina e como resultado os níveis de insulina elevam-se na corrente sanguínea²⁴.

O aumento de ácidos graxos livres pode provocar o aumento de TRI, o que altera o processo de sinalização da insulina. Um efeito similar pode ocorrer no fígado e no pâncreas, levando ao acúmulo de lipídio hepático e pancreático, resultando no aumento de enzimas hepáticas e alterações da secreção de insulina²⁵⁻²⁷.

Para produzir TRI, o corpo precisa de HDL e LDL. As moléculas de HDL sofrem um ataque quando o fígado recolhe partes suas para produzir o TRI, como resultado, o nível de HDL no sangue cai. As moléculas de LDL ficam de menor tamanho, dificultando sua captação do sangue pelo fígado, então continuam circulando no sangue, podendo fixar-se nas paredes arteriais²⁸.

Para completar o quadro, os altos níveis de insulina provocados pela RI fazem a pressão arterial subir acima do normal, levando a HAS. Embora não esteja claro como isso exatamente ocorra, sabe-se que aumenta o risco de infarto e de derrame cerebral²⁹.

Durante todo esse processo, os distúrbios provocados pela insulina, elevam a glicose no sangue dando início a um processo lento e destrutivo. A combinação entre SM e DM pode levar a um processo aterogênico e consequentes problemas cardíacos³⁰.

Na segunda proposta da etiologia da SM, alguns hormônios são envolvidos. O tecido adiposo é reconhecido como órgão com múltiplas funções e tem um papel central na gênese da RI. Atualmente, sabe-se que o adipócito recebe a influência da insulina, do cortisol e das

catecolaminas, e, como resposta, secreta uma grande variedade de substâncias que atuam, tanto local como sistemicamente, na regulação de processos como a função endotelial, aterogênese, sensibilidade à insulina e regulação do balanço energético¹.

1.1.1.1 Papel endócrino e inflamatório do tecido adiposo

O tecido adiposo secreta vários fatores denominados adipocinas. Dentre elas podemos citar: TNF- α , IL-6, PCR, resistina, adiponectina e leptina. Estas adipocinas estão relacionadas, direta ou indiretamente, a processos que contribuem para a aterosclerose, HAS, RI, DM2 e dislipidemias, elas representam o elo entre adiposidade, SM e DCV, sendo que na obesidade a expressão da maioria das adipocinas aparece elevada, diretamente proporcional ao maior volume das células adiposas³¹.

O TNF- α é uma citocina de ação direta no adipócito, promovendo indução de apoptose, inibição da lipogênese, bem como aumento da lipólise, cumprindo um importante papel regulador no acúmulo de gordura no tecido adiposo³¹.

A IL-6 e o TNF- α , inibem a lipogênese e aumentam a liberação de ácidos graxos livres e glicerol, assim como, a expressão aumentada de IL-6 esta relacionada à supressão de leptina e estimulação da produção de PCR³¹.

A PCR é um marcador inflamatório e um fator de risco para doenças DCV. O tecido adiposo abdominal tem sido considerado preditor de elevadas concentrações de PCR devido à significativa expressão nos depósitos de gordura abdominal, visceral e subcutâneo³¹.

A resistina que promove a RI pelo aumento da glicogênese hepática afetando este tecido rapidamente, tem também uma potente ação aterogênica pelo aumento da expressão de moléculas de adesão em células endoteliais vasculares³¹.

A adiponectina que é um hormônio expresso exclusivamente nos adipócitos diferenciados, age como fator protetor para DCV, pois seu nível está diminuído em pacientes com obesidade e SM. Ela complica a sensibilidade à insulina pelo aumento da oxidação de ácidos graxos devido à captação e utilização da glicose no músculo esquelético e tecido adiposo e redução da liberação de glicose hepática, levando ao melhor controle dos níveis séricos de glicose, ácidos graxos livres e TRI³¹.

A leptina é um importante regulador do balanço energético, por aumentar a oxidação lipídica no músculo esquelético, reduzindo a síntese de TRI a partir de ácidos graxos monoinsaturados no fígado³¹.

Um possível elo entre SM e inflamação é a RI. A relação entre RI e processo inflamatório é bidirecional, ou seja, qualquer processo inflamatório induz RI, e esta acentua o processo inflamatório. A reação inflamatória induzida pelos fatores de risco da SM e a resposta imunológica associada são os principais eventos que conduzem ao processo de aterogênese provocados pela SM³².

Em pessoas obesas ocorre excreção de citocinas pró-inflamatórias pelos adipócitos, e os níveis altos de citocinas predispoem o risco de desenvolver SM, logo, quanto maior a presença de tecido adiposo, maior a associação entre inflamação (níveis aumentados de citocinas pró-inflamatória) e SM. As citocinas pró-inflamatórias de maior relevância neste caso são: IL-6, TNF- α e a IL-18³².

Secretada por células endoteliais, células musculares lisas, monócitos, macrófagos e pelo tecido adiposo central, a IL-6 pode contribuir para o desenvolvimento da lesão aterosclerótica, hiperinsulinemia e SM, sendo mediadora central da resposta inflamatória de fase aguda e a principal citocina pró-coagulante, pois determina a produção e a elevação das concentrações plasmáticas estimuladas pelo fígado de fibrinogênio, proteína amilóide sérica A (SAA), e em especial, da PCR³².

Assim como a IL-6, o TNF- α é mediador central da resposta inflamatória de fase aguda, pois também determina a produção e a elevação das concentrações plasmáticas de fibrinogênio, SAA, PAI-1 e PCR, produzidos pelos hepatócitos; pode induzir a expressão de IL-6 no tecido adiposo e promover a expressão endotelial de moléculas de adesão celular (CAM)³².

A IL-18 induz a secreção das citocinas IL-6, TNF- α das moléculas de adesão endotelial intracelular-1 (ICAM-1) e das moléculas de adesão endotelial vascular-1 (VCAM-1). A IL-18 induz a expressão de diversas metaloproteinases, que fragilizam a capa fibrosa da lesão aterosclerótica, tornando uma placa vulnerável³².

As citocinas anti-inflamatórias mais relevantes são a IL-10 e adiponectina.

A IL-10 é produzida por linfócitos B e T, monócitos e macrófagos. Exerce efeito anti-inflamatório no sistema vascular inibindo a interação de células endoteliais e leucócitos, inibe citocinas pró-inflamatórias e a produção de citocinas por macrófagos ou linfócitos³².

A adiponectina também está associada à SM também pela regulação de citocinas pró e anti-inflamatórias. Sua ação anti-inflamatória e anti-aterogênica se dá pela diminuição da

expressão de CAM, diminuição da quimiotaxia do macrófago para formação de células espumosas e inibição da sinalização inflamatória no tecido endotelial. Em pacientes obesos ou com SM, este hormônio encontra-se diminuído^{31,32}.

Os marcadores de inflamação sintetizados por hepatócitos mais relevantes são: PCR, fibrinogênio e SAA. Ambos são sintetizados sob o estímulo das citocinas derivadas de adipócitos IL-6 e TNF- α .

A PCR é sintetizada pelo fígado, regulada pelas citocinas IL-6, e TNF- α , adipócitos e tecido arterial. Níveis elevados de PCR aparecem em situações inflamatórias crônicas, como por exemplo, na aterosclerose. Está envolvida na patogênese da aterosclerose por meio dos seguintes mecanismos: inibe a transcrição da óxido-nítrico-sintase endotelial nas células endoteliais, o qual leva a um decréscimo na liberação basal de óxido nítrico; promove a expressão de CAM pelas células endoteliais e promove a captação de colesterol pelos macrófagos e estimula os monócitos a produzir IL-6 e TNF- α ³².

O decréscimo na sensibilidade à insulina pode levar ao aumento da expressão de PCR pela diminuição dos efeitos fisiológicos da insulina (efeitos anti-inflamatórios) na síntese hepática de proteínas de fase aguda. Algumas limitações devem ser levadas em consideração, pois seus níveis séricos podem elevar-se transitoriamente por duas a três semanas depois de uma grande infecção, trauma ou evento isquêmico agudo³².

O aumento do fibrinogênio está correlacionado aos componentes da SM e pode predizer risco para DM e DCV, pois promove trombose por meio do aumento de fibrina, agregação plaquetária e viscosidade plasmática, e participa da aterosclerose proliferando células endoteliais e da musculatura lisa vascular³².

A SAA é uma proteína de fase aguda sintetizada pelos hepatócitos após estímulo de IL-6 e TNF- α . Tanto a SAA como a PCR refletem inflamação sistêmica. A SAA não somente tem um efeito direto na aterogênese, como também pode promover a desestabilização da placa aterosclerótica, por isso, é um marcador inflamatório que complementa a PCR em predizer eventos cardiovasculares futuros³².

Estes marcadores auxiliam o diagnóstico da SM, pois estas pessoas se encontram numa situação clínica inflamatória.

1.2 Aterosclerose e inflamação

A SM refere-se a várias patologias e fatores de risco associados a eventos cardiovasculares. Desta forma, talvez a SM seja um apanhado de fatores de risco coronariano associados. O diagnóstico da SM, a partir dos critérios do NCEP ATP III ou OMS, está associado com um maior risco cardiovascular e uma maior prevalência de DCV³³.

A aterosclerose é reconhecida atualmente como uma doença inflamatória. Elevados níveis plasmáticos de colesterol, especialmente a LDL, são considerados como um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento desta doença, determinando o acúmulo de lipídios ao longo da parede das artérias³⁴. De acordo com relatos da Associação Americana de Cardiologia, a DCV é a principal causa de mortalidade nos Estados Unidos da América (EUA) e responsável por mais da metade dos óbitos em países desenvolvidos³⁵.

As principais manifestações clínicas das DCVs incluem infarto do miocárdio, doença arterial coronariana, acidente vascular cerebral, doença arterial periférica e insuficiência cardíaca. Em muitos casos, estes desfechos clínicos resultam da aterosclerose, patologia progressiva da parede arterial caracterizada por espessamento focal e obstrução luminal³⁴.

Aproximadamente há 100 anos, foi sugerida uma relação entre infecção e inflamação na aterosclerose. Adicionado aos tradicionais fatores de risco como hipertensão, hiperlipidemia, DM, tabagismo, estresse, obesidade e fatores genéticos, a infecção crônica poderia estabelecer um fator de risco adicional para aterosclerose³⁶. Patógenos como citomegalovírus, herpes vírus simples, *Helicobacter pylori*, hepatite A e principalmente a *Chlamydia pneumoniae* são exemplo de agentes patogênicos que podem estar associados com a aterosclerose³⁷.

O conhecimento da fisiologia da aterosclerose evoluiu muito nas últimas décadas. Atualmente, sabe-se que os mecanismos que culminam com o ateroma envolvem fatores genéticos, ambientais e a resposta inflamatória que parece participar de todas as fases da sua formação³⁸⁻⁴⁰.

A placa aterosclerótica é formada por um núcleo acelular de lipídios e substâncias necróticas, circundado por células espumosas (macrófagos que englobaram moléculas de lipídios). O processo de oxidação do LDL foi identificado como um precoce evento pró-aterogênico que promove a formação das células espumosas⁴¹⁻⁴⁴. A capa externa do ateroma é composta por células musculares lisas e tecido conjuntivo fibroso⁴⁵. A **figura 1** mostra a composição de um ateroma.

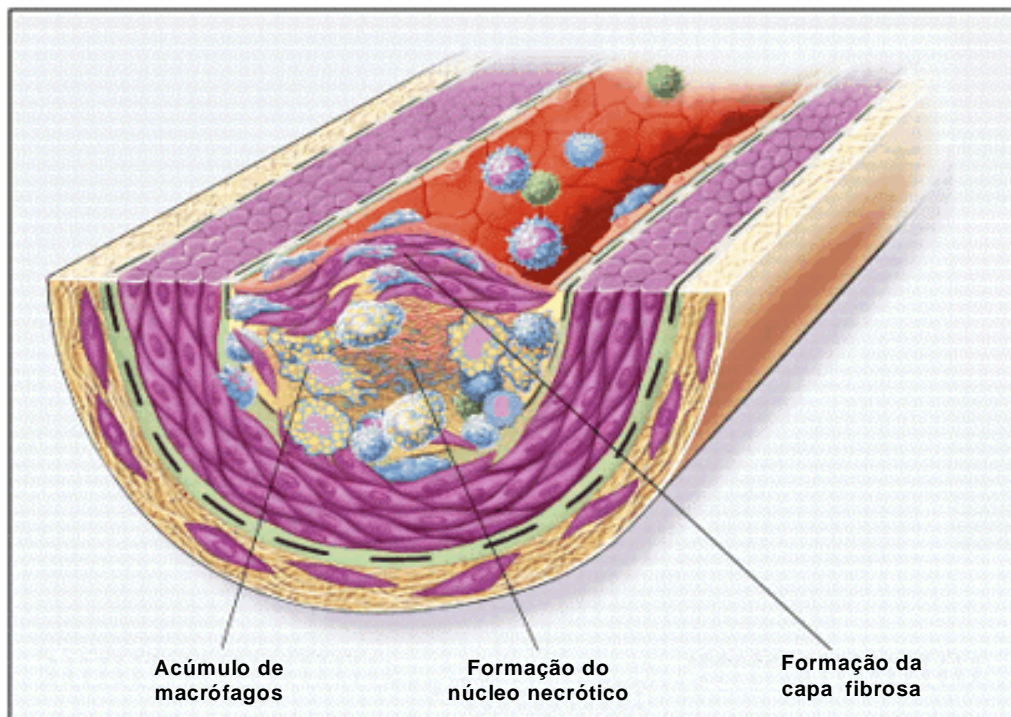


Figura 1: Placa de ateroma totalmente formado.
Adaptado de Ross R. *N Engl J Med.* 1999;340:115-26

Os fatores de risco tradicionais para aterosclerose incluem elevados níveis séricos de colesterol, HAS, DM, obesidade, tabagismo e sedentarismo, que contribuem tanto para o início e progressão de lesões ateroscleróticas, quanto para deflagrar uma série de mecanismos regulatórios e inflamatórios ao longo da parede arterial. A relação causal entre colesterol sanguíneo elevado e aterosclerose está estabelecida.

O colesterol que se acumula em macrófagos é originário do LDL circulante^{41,42}. Contudo, o LDL precisa ser modificado antes de sua captação pelos macrófagos e sua oxidação representa tal processo³⁴. O LDL oxidado (LDL-ox) é removido da circulação pelos receptores de LDL situados nas células endoteliais e monócitos-macrófagos. Steinberg (1996), mostra um componente inflamatório na aterosclerose envolvendo a desregulação da homeostase do colesterol por interação aberrante entre mediadores inflamatórios e elementos modulados por lipídeos⁴⁶.

O LDL-ox atua como agente quimiotático pró-inflamatório para macrófagos e linfócitos T, sendo citotóxico para células endoteliais estimulando a liberação de mediadores pró-inflamatórios^{42,47}. Em adição, o LDL-ox tem sido encontrado em lesões ateroscleróticas tanto murinas quanto humanas⁴⁸. A oxidação do LDL pode gerar epítopos imunogênicos capazes de produzir autoanticorpos⁴⁹.

Após a ativação endotelial pelos fatores de risco, CAM expressas na superfície endotelial recrutam leucócitos, monócitos e macrófagos para a camada íntima dos vasos. A expressão das CAMs é controlada por IL-1, IL-4, TNF- α e interferon-gama (INF- γ), a maioria sintetizada por macrófagos, linfócitos e pelo próprio endotélio^{34,45,50}.

As ICAM-1 e 2 e as VCAM-1, produzidas pelo endotélio, permitem a adesão e passagem de células inflamatórias para o interior do vaso; o estresse oxidativo dos macrófagos que se segue gera a produção de monocinas que aumentam a resposta inflamatória intravascular^{51,52}.

Após o estabelecimento das células do sistema imune na camada íntima, inicia-se a captação de LDL-ox pelos macrófagos através dos receptores “lixeiros”, que transforma os macrófagos em células espumosas⁵³. Atualmente, sabe-se que um considerável montante do LDL circulante está acoplado à molécula de beta2-glicoproteína I (beta2-gpI), um cofator fosfolipídico de propriedades anticoagulante. Digno de nota, o complexo LDL-ox – beta2-gpI pode ser internalizado no macrófago somente através de anticorpos, e não através do receptor lixo⁵⁴. Recentemente, demonstrou-se que o complexo LDL-ox – beta2-gpI pode ser encontrado na circulação periférica de pacientes com inúmeras doenças inflamatórias crônicas e autoimunes, assim como em alguns pacientes com Síndrome Coronariana Aguda⁵⁴.

Sequencialmente, macrófagos sob estresse oxidativo produzem IL-1 e IL-6, estimulando a migração de células musculares lisas da camada média para a íntima formando a capa fibrosa do ateroma. O rompimento da placa aterosclerótica (que gera instabilidade vascular e estado pró-trombótico) pode decorrer do acúmulo de macrófagos e células T no núcleo do ateroma, por apoptose das células musculares lisas^{55,56}.

Dentro do contexto de aterosclerose como síndrome autoimune, nosso grupo de pesquisa da Pós-Graduação da PUCRS avaliou, em anos recentes, a associação de autoanticorpos, em particular antifosfolípidos e antiproteínas de choque térmico (Hsp), com doença aterosclerótica. Os estudos, de casos-controles, confirmaram uma associação entre o anticorpo de fase aguda (IgA) anti-beta2-gpI e doença isquêmica cerebral, coronária, doença arterial periférica e doença carotídea⁵⁷⁻⁶⁰.

De importância, os anticorpos IgA anti-beta2-gpI vistos na doença aterosclerótica têm como alvo o domínio 4 da molécula de beta2-gpI, diferentemente do que ocorre na síndrome antifosfolipídica, onde os anticorpos são dirigidos contra o domínio 1 da molécula⁶¹. No que diz respeito à autoanticorpos contra Hsp, documentamos associação entre presença de anticorpos anti-Hsp60 humana e anti-Hsp65 bacteriana com isquemia cerebral aguda⁶⁰.

A disfunção endotelial é considerada o evento inicial de uma série de doenças de natureza inflamatória ou imune, como as vasculites e aterosclerose. O endotélio, como interface entre os elementos circulantes e os tecidos, apresenta a barreira primordial de proteção contra qualquer tipo de agressão. Em circunstâncias de lesão ou doença, e sob o efeito de IL-1 e TNF, as células endoteliais passam ao estado ativado, caracterizado pela diminuição na produção de trombospondina e fator tecidual, predispondo a agregação plaquetária e a coagulação⁶².

Quando a superfície endotelial de lesões ateroscleróticas se torna danificada e instável, pode haver a ruptura do ateroma, resultando em oclusão total do vaso sanguíneo e necrose tecidual, o que é verificado tanto no infarto agudo do miocárdio quanto no acidente vascular cerebral isquêmico como alguns patógenos também podem estar associados com a aterosclerose por sua infecção e ativação do sistema imunológico, justifica a verificação do papel da *Chlamydia trachomatis* (CT) na aterosclerose.

1.3 *Chlamydia trachomatis*

A Clamídia, um tipo de bactéria gram-negativa, que é parasita intracelular obrigatória de células eucarióticas, amplamente distribuídas no reino animal. São patógenos capazes de infectar animais de sangue quente e frio e vários tipos de células⁶³.

Essa bactéria possui restrições metabólicas, sendo incapaz de sintetizar trifosfato de adenosina (ATP) e necessita de fonte externa desta energia⁶⁴. Por isto é um patógeno intracelular obrigatório para obter energia⁶⁵.

Taxonomicamente foram classificados primeiramente na ordem *Chlamydiales*, com um único gênero *Chlamydia* e quatro espécies conhecidas: *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia psittaci* e *Chlamydia pecorum*, todas associadas a doenças humanas, exceto a *C. pecorum*⁶⁶. Mas hoje, Stephens, *et al* (2009) sugerem uma taxonomia diferenciada, baseada na sequência genética, composta por oito espécies: *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia muridarum*, *Chlamydia pecorum*, *Chlamydia felis*, *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia abortus* e *Chlamydia caviae*⁶⁷.

A CT apresenta uma transmissão predominantemente sexual e, no caso de contágio de recém-nascidos, vertical. Pode causar infecções oculares, como tracoma e infecções

urogenitais em homens e mulheres como uretrite não gonocócica e cervicites mucopurulentas⁶⁸.

As infecções urogenitais na mulher podem causar salpingite, cervicite, uretrite, endometrite, doença inflamatória pélvica, infertilidade e gravidez ectópica. Em mulheres grávidas a infecção pode resultar em aborto espontâneo no primeiro trimestre, natimorto, ruptura prematura de membranas e parto prematuro. No neonato pode causar conjuntivite de inclusão, infecções em orofaringe, otite média e pneumonia⁶⁹. A CT têm sido suspeita de causar infecção bronco pulmonar em adultos imunocompetentes, e pneumonia em pacientes imunocomprometidos^{70,71}.

Sobre sua sorovariedade há pelo menos dezenove descritas, sendo L1, L2, L2', L2a, L2b e L3, responsáveis pelo linfogranuloma venéreo, uma doença sexualmente transmissível (DST) que acomete os linfonodos inguinais⁷². As sorovariedades A, B, Ba e C, estão relacionados com o tracoma, caracterizado por conjuntivite e cicatrização da córnea e conjuntiva; e as D, Da, E, F, G, H, I, Ia, J, Ja e K, relacionam-se com infecções de transmissão sexual e infecções perinatais^{73,74}.

Recentemente foram identificados três novos genótipos a partir de uma cepa de referência da sorovariedade Ba, classificados como Ba1, Ba2 e Ba3. Os autores sugerem que as mutações apresentadas pela Ba, pode interferir no tropismo tecidual da bactéria e mediar a invasão de outros sítios mucosos⁷⁵, como observado em estudo realizado por Millman *et al* (2004), em que um recombinante Ba/D foi isolado a partir de uma amostra urogenital⁷⁶.

O **quadro 2** mostra a relação da sorovariedade da CT e as doenças causadas em humanos.

SOROTIPO	SEXO	DOENÇA
A, B, BA, C	Ambos	Tracoma, conjuntivite, ceratite
	Feminino	Uretrite, cervicite, endometrite, salpingite
	Masculino	Uretrite, prostatite, epididimite
D, Da, E, F, G, H, I, Ia, J, K	Ambos	Conjuntivite, prostatite, síndrome de Reiter
	Neonatos	Oftalmia neonatorum, pneumonia
	Ambos	Linfogranuloma venéreo

Quadro 2. Doenças humanas causadas por *Chlamydia trachomatis*.

Fonte: Francisco W (2001), Gonococcias e Clamídia. In Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Autoimunes.

De acordo com a OMS, 92 milhões de novos casos de CT são diagnosticados por ano no mundo. A maior ocorrência maior em jovens sexualmente ativos, com prevalência variando de 5 a 20%^{77,78}.

A CT é uma DST mais comum entre as infecções bacterianas em todo o mundo, particularmente entre pessoas menores de 25 anos que vivem em países industrializados como nos EUA e Inglaterra⁷⁹.

O relatório anual do *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) refere que 1.108,374 casos de infecção por CT foram notificados nos EUA em 2007⁸⁰.

No Brasil, os dados do Ministério da Saúde sugerem que ocorra mais de um milhão de casos da infecção clamidial na população sexualmente ativa, com a prevalência varia de acordo com a população estudada e o método diagnóstico adotado⁸¹⁻⁸³. Teles *et al* (1997) avaliaram 407 mulheres do Ambulatório de Planejamento Familiar, em Campinas, São Paulo e encontraram uma prevalência de 7% da bactéria⁸⁴.

Na cidade de Porto Alegre, no Rio Grande do Sul, mulheres de uma vila popular apresentaram uma prevalência de 0,59%⁸⁵. Outro estudo realizado em Vitória, no Espírito Santo, constatou uma prevalência de 12,2% em mulheres adolescentes sexualmente ativas⁸⁶ e a prevalência de 20,7% foi detectada na cidade de Manaus, na Amazônia, em mulheres atendidas nos serviços especializados em DST⁸⁷.

O grande desafio do controle de infecção clamidial é que 70% a 80% das mulheres e mais de 50% dos homens infectados não apresentam nenhum sintoma. Isto resulta em um

grande reservatório de indivíduos desconhecidos, infectados, que são capazes de transmitir a infecção aos seus parceiros sexuais⁸⁸.

1.3.1 Patogenia

Por se tratar de uma bactéria intracelular obrigatória, a CT infecta uma grande variedade de células eucarióticas, mas só se replica dentro de células epiteliais. O ciclo de desenvolvimento é semelhante entre as espécies e cepas, e ocorre dentro de um vacúolo, conhecido como inclusão clamidial, dentro da célula hospedeira⁸⁹.

As clamídias têm um ciclo de vida bifásico, com duas formas morfológicas distintas. O corpo elementar, forma infecciosa e metabolicamente inativa, é endocitado pela célula hospedeira em vesículas citoplasmáticas, onde a CT impede a fusão com os lisossomos. O corpo elementar se transforma na forma não-infecciosa e metabolicamente ativa denominada corpo reticular, que se multiplica por fissão binária. Alguns corpos reticulares se transformam novamente na forma infecciosa e são liberadas para o exterior após lise da célula hospedeira, quando os corpos elementares podem, então, infectar outras células⁹⁰. A **figura 2** demonstra, em resumo, o ciclo celular da *Chlamydia*.

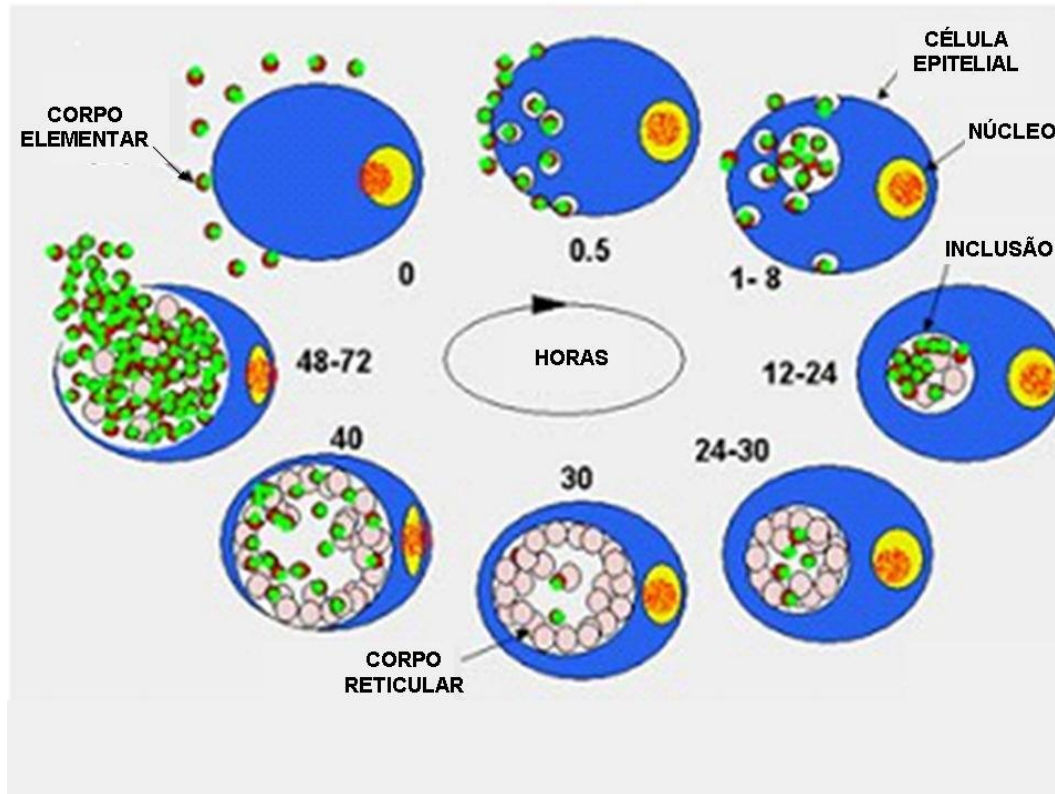


Figura 2. Ciclo celular da *Chlamydia*.

Adaptado de Pandeye D, et al. *Internet J Infect Dis*. 2009: v.7, n.1.

De início, a imunidade humoral na forma de IgA exerce a defesa contra a principal proteína externa da membrana (MOMP) da bactéria, determinando se a infecção vai se desenvolver ou evoluir para a cura⁹¹.

A resposta à infecção aguda pelo hospedeiro ocorre dentro de 1 a 2 dias e se caracteriza pela inflamação e infiltração da mucosa com neutrófilos, que destroem os corpos elementares acessíveis, enquanto que os linfócitos T se acumulam e controlam a infecção através da liberação de IL-2, IL-12 e INF- γ , levando a uma resposta protetora efetiva para a resolução da infecção, através da destruição de células infectadas pelos linfócitos T citotóxicos, fagocitose de corpos elementares livres pelos macrófagos ativados ou ação direta no metabolismo da *Chlamydia* pelo INF- γ e TNF⁹¹.

Os corpos elementares permanecem dentro da inclusão clamidial sem sofrer a ação das enzimas lisossomais e sem serem reconhecidos pelo sistema imune, pois a CT é capaz de modificar as características da membrana da inclusão tornando-a uma vesícula não-lisossomal com capacidade de reter esfingolipídios provenientes do complexo de Golgi na membrana⁹². A CT pode liberar uma protease responsável por degradar os fatores de transcrição necessários para induzir a expressão das moléculas do complexo principal de

histocompatibilidade (MHC) do tipo I, responsáveis por apresentar antígenos intracelulares aos linfócitos T citotóxicos⁹³.

Esses fatores permitem que os corpos elementares tenham um ambiente favorável para a diferenciação em corpos reticulados, que iniciam intensa divisão celular.

Durante o processo de diferenciação, a CT é capaz de inibir o processo de apoptose da célula infectada favorecendo sua sobrevivência no meio intracelular. Esse processo está relacionado com a secreção de proteases, que atuam na clivagem de proteínas do hospedeiro responsáveis pela indução da apoptose⁹⁴. Por outro lado, a CT induz apoptose, estimulando a secreção de TNF- α ou ativando proteínas pró-apoptóticas⁹⁵.

No final do ciclo, os corpos reticulados voltam a se diferenciar em corpos elementares, e nesse estágio, a indução de apoptose favorece a propagação bacteriana.

Os corpos elementares podem também sair da célula através de exocitose. A ativação dos mecanismos imunológicos do hospedeiro diminui o número de corpos elementares no meio extracelular e inibe a replicação dos corpos reticulados dentro da inclusão clamidial. No entanto, como mecanismo de evasão, a bactéria pode manter-se em uma forma intracelular amorfa persistente, e quando a ativação do sistema imune cessa, os corpos reticulados voltam a se replicar, iniciando um novo ciclo⁹⁶.

Durante a indução da forma persistente há a diminuição da regulação da maioria das proteínas clamidiais, porém, com um aumento na expressão da Hsp60⁹⁷. Alguns trabalhos mostram que as infecções persistentes estão relacionadas com aumento dos níveis de expressão da Hsp60 da *Chlamydia*, com um declínio nos níveis da MOMP^{91,97,98}.

Um mecanismo tem sido proposto para explicar a patogênese da infecção crônica que os receptores para Hsp60 expressos por macrófagos ativados e células teciduais estimulariam a produção de INF- γ . E a liberação de superóxido durante o curso de uma inflamação pelos macrófagos pode estimular a produção de Hsp pela célula do hospedeiro. Em resposta, ocorrem alterações na temperatura, pH e pressão parcial de oxigênio, assim como a fagocitose, favorecendo a evolução para infecção crônica⁹¹.

Existe, a possibilidade de dano tecidual autoimune, em consequência da reação cruzada da Hsp60 da *Chlamydia* expressada na superfície das células infectadas, e a expressão aumentada de Hsp humana induzida secundariamente ao dano inflamatório pelos linfócitos T citotóxicos⁹¹.

O mecanismo real da patogênese pelo qual a infecção por CT prossegue da fase aguda para a crônica ainda não está completamente esclarecido. Este mecanismo parece estar intimamente relacionado com o equilíbrio entre os mecanismos de defesa do hospedeiro e o

patógeno. Vários fatores interligados parecem ter seu papel: fatores genéticos, endócrinos, perfil das citocinas, infecções prévias, virulência do patógeno ou a quantidade da bactéria, a presença de outras infecções genitais e a via de infecção⁹¹.

Infecções bacterianas podem ser um gancho para o desenvolvimento de DCV, mas também infecções disseminadas e pneumonias podem induzir a DCV⁹⁹, e a CT pode induzir DCV seguido pela infecção do trato respiratório. Fan, *et al* (1999), em um estudo experimental com ratos, observou que a CT não só provoca pneumonia, mas também infecção disseminada e a pneumonia pode induzir patologias cardíacas¹⁰⁰. Mavrogeni, *et al* (2008), demonstram a presença de miocardite causada pela CT em um paciente com ocorrências anteriores de prostatite¹⁰¹.

1.3.2 *Chlamydia* e aterosclerose

O elo do patógeno com a SM pode estar relacionado com as funções imunológicas em resposta ao processo infeccioso. A inflamação é mediada pelo aparecimento de ICAM-1 no endotélio e de mediadores inflamatórios liberados pelas células teciduais e leucócitos. Os leucócitos ativados pela lesão tecidual ou pela presença de LDL ou por um agente infeccioso na parede vascular ou qualquer sítio orgânico, sintetizam IL-1, IL-6, TNF- α e conseqüentemente PCR que se correlaciona com o risco de DCV¹⁰¹.

As características da SM estão moderadamente associadas com níveis elevados de PCR sendo um indicio para a relação da SM com os aspectos inflamatórios¹⁰², portanto, a inflamação por uma bactéria pode ser o fator inicial responsável pelas comorbidades associadas a SM e DCV.

Há indícios de que a *Chlamydia pneumoniae* pode infectar as células envolvidas na aterogênese, incluindo células endoteliais, células musculares lisas, macrófagos e linfócitos e pode estar envolvida em todos os estágios do processo de formação do ateroma, desde a lesão inflamatória inicial até a ruptura da placa¹⁰³. Estudos genéticos indicam uma diferença no genoma e formação de proteínas da CT comparada com a *Chlamydia pneumoniae*¹⁰⁴, podendo ambas, agirem diferentemente no sistema orgânico.

Fryer *et al* (1997) confirmaram a infecção de CT em culturas celulares endoteliais da veia umbilical humana¹⁰⁵. Outro estudo confirma a participação da CT na infecção de células

endoteliais, mas sem induzir a expressão de IL-8 e ICAM-1¹⁰⁶. Então, a CT pode participar na formação do ateroma, mas pode ter uma ação diferenciada da *Chlamydia pneumoniae*.

Sabe-se hoje que as proteínas de membrana da CT induzem doenças inflamatórias em ratos e produzem autoanticorpos para o músculo cardíaco, que estão associados com infecções cardíacas⁹⁹.

Estas proteínas participam da formação ateromatosa, sua exposição à lipopolissacarídeos e a Hsp60 da *Chlamydia* pode induzir os macrófagos a uma maior captação de LDL-ox, o que incrementa a formação de células espumosas. A Hsp60 originária da *Chlamydia pneumoniae* teria, assim, uma função pró-inflamatória no ateroma. Além disso, antígenos da *Chlamydia* parecem deflagrar um aumento da expressão de IL-18 em pacientes com aterosclerose coronária¹⁰⁷⁻¹⁰⁹.

A estabilização da placa também é afetada pela presença intravascular da CT. As Hsp60 bacterianas estimulam os macrófagos a produzirem metaloproteases que desestabilizam a placa. As Hsp60 aumentam a expressão de fator tecidual, induzindo um estado pró-coagulante; além disso, inibem a síntese de colágeno, aumentando a vulnerabilidade da placa aterosclerótica e consequentemente induzindo risco de ruptura desta estrutura^{110,111}.

A inflamação subclínica crônica é cada vez mais caracterizada como parte da SM. Como já citado anteriormente, a desregulação no sistema inflamatório prevê o desenvolvimento de RI e DM2, componentes da SM^{112,113}.

Um estudo feito por Nabipour, *et al* (2006) reporta que infecções por Herpes virus tipo 1, citomegalovírus, *Helicobacter pylori* e *Chlamydia pneumoniae* estão elevadas em pacientes com SM e induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias tais como TNF- α , IL-6 e PCR levando a uma inflamação crônica, RI, SM e consequentemente ao processo inflamatório da arteriosclerose¹¹⁴.

2 JUSTIFICATIVA

Se o processo inflamatório contribui para a RI e resultante SM, ou se é uma consequência da SM que gera eventos cardíacos, é ainda desconhecido. Os potenciais “gatilhos” infecciosos para SM foram incompletamente estudados até o momento.

Desta forma, é de interesse avaliar a frequência de anticorpos anti-*Chlamydia trachomatis* de memória (IgG) e de fase aguda (IgA) na SM associada ou não a eventos cardiovasculares prévios comparativamente a controles sadios.

3 HIPÓTESES

3.1 Hipótese Operacional

A prevalência de anticorpos anti-*Chlamydia trachomatis* não está aumentada na SM (associada ou não a eventos cardiovasculares prévios) comparativamente a controles sadios.

3.2 Hipótese Conceitual

A prevalência de anticorpos anti-*Chlamydia trachomatis* está aumentada na SM (associada ou não a eventos cardiovasculares prévios) comparativamente a controles sadios.

4 OBJETIVO

Avaliar a prevalência de anticorpos IgG e IgA anti-*Chlamydia trachomatis* em pacientes com SM com e sem evento cardiovasculares prévios, comparados a controles sadios.

REFERÊNCIAS

1. Ribeiro Filho FF, Mariosa LS, Ferreira SRG, Zanella MT. Gordura visceral e síndrome metabólica: mais que uma simples associação. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2006 Abr;50(2):230-43.
2. Rodrigues AS, Trindade EBSM. Mecanismos neuroendócrinos no desenvolvimento da síndrome metabólica. *Rev Bras Nutr Clin.* 2006;21(4):320-5.
3. Siqueira AFA, Abdalla DSP, Ferreira SRG. LDL: da síndrome metabólica à instabilização da placa aterosclerótica. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2006 Abr;50(2):334-43.
4. Lopes HF. Hipertensão arterial e síndrome metabólica: além da associação. *Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo.* 2003 Jan-Fev;13(1):64-77.
5. Reaven GM. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes.* 1988 Dec;37(12):1595-607.
6. Ray JG, Lonn E, Yi Q, Rathe A, Sheridan P, Kearon C, et al. Venous thromboembolism in association with features of the metabolic syndrome. *Q J Med.* 2007 Nov;100(11):679-84.
7. Lottenberg SA, Glezer A, Turatti LA. Metabolic syndrome: identifying the risk factors. *J Pediatr (Rio J).* 2007 Nov;83 Suppl 5:S204-8.
8. Aguilar-Salinas CA, Rojas R, Gómez-Pérez FJ, Franco A, Olaiz G, Rull JA, et al. The metabolic syndrome: a concept in evolution. *Gac Med Mex.* 2004 Jul-Ago;140 Suppl 2:S41-8.
9. Santos CRB, Portella ES, Avila SS, Soares EA. Fatores dietéticos na prevenção e tratamento de comorbidades associadas à síndrome metabólica. *Rev Nutr.* 2006 Maio-Jun;19(3):389-401.
10. Steemburgo T, Dall'alba V, Gross JL, Azevedo MJ. Fatores dietéticos e síndrome metabólica. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2007;51(9):1425-33.

11. Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, et al. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation*. 2005 Oct;112(17):2735-52.
12. I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica. *Arq Bras Cardiol*. 2005 Abr;84 Suppl 1:1-28.
13. Ford ES, Guiles WH, Dietz WH. Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *JAMA*. 2002 Jan;287(3):356-9.
14. Alberti, KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med*. 1998 Jul;15(7):539-53.
15. Balkau B, Charles MA. Comment on the provisional report from the WHO consultation. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR). *Diabet Med*. 1999 May;16(5):442-3.
16. Executive summary of the third report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (adult treatment panel III): Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. *JAMA*. 2001 May;285(19):2486-97.
17. Guías ILIB para el diagnóstico y manejo de las dislipidemias en Latinoamérica. Resume Ejecutivo. *Lipid Digest Latinoamerica*. 2002;8:2-8.
18. Bloomgarden ZT. American Association of Clinical Endocrinologists (AACE) consensus conference on the insulin resistance syndrome: 25-26 August 2002, Washington, DC. *Diabetes Care*. 2003 Apr;26(4):1297-303.
19. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J; IDF Epidemiology Task Force Consensus Group. The metabolic syndrome--a new worldwide definition. *Lancet*. 2005 Sep;366(9491):1059-62.
20. Ritchie SA, Connell JM. The link between abdominal obesity, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2007 May;17(4):319-26.

21. Huang PL. A comprehensive definition for metabolic syndrome. *Dis Model Mech.* 2009 May-Jun;2(5-6):231-37.
22. Deen D. Metabolic syndrome: time for action. *Am Fam Physician.* 2004 Jun;69(12):2875-82.
23. Raczak G, Pinna GD, La Rovere MT, Maestri R, Danilowicz-Szymanowicz L, Ratkowski W, et al. Cardiovagagal response to acute mild exercise in young healthy subjects. *Circ J.* 2005 Aug;69(8):976-80.
24. Groop LC, Saloranta C, Shank M, Bonadonna RC, Ferrannini E, DeFronzo RA. The role of free fatty acid metabolism in the pathogenesis of insulin resistance in obesity and noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab.* 1991 Jan;72(1):96-107.
25. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med.* 1967 Jul;70(1):158-69.
26. Prajde N, Weber G. Malignant transformation-linked imbalance: decreased xanthine oxidase activity in hepatomas. *FEBS Lett.* 1975 Nov;59(2):245-9.
27. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem.* 1988 Mar;34(3):497-500.
28. Kroon PA, Powell EE. Liver, lipoproteins and disease: I. Biochemistry of lipoprotein metabolism. *J Gastroenterol Hepatol.* 1992 Mar;7(2):214-24.
29. Addison S, Stas S, Hayden MR, Sowers JR. Insulin resistance and blood pressure. *Curr Hypertens Rep.* 2008 Aug;10(4):319-25.
30. Haffner SM, Miettinen H. Insulin resistance implications for type II diabetes mellitus and coronary heart disease. *Am J Med.* 1997 Aug;103(2):152-62.
31. Hermsdorff HHM, Monteiro JBR. Gordura visceral, subcutânea ou Intramuscular: Onde está o problema? *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2004 Dec;48(6):803-11.

32. Volp ACP, Alfenas RCG, Costa NMB, Minim VPR, Stringueta PC, Bressan J. Capacidade dos biomarcadores inflamatórios em predizer a síndrome metabólica. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2008 Apr;52(3):537-49.
33. International Diabetes Federation. The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome. 2004 [capturado em 2009 Set 27]. Disponível em: http://www.idf.org/webdata/docs/Metac_syndrome_def.pdf
34. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999 Jan;340(2):115-26.
35. Rosamond W, Flegal K, Furie K, Go A, Greenlund K, Haase N, et al. Heart disease and stroke statistics --2008 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation.* 2008 Jan;117(4):e25-146.
36. Wilson PW, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H, Kannel WB. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation.* 1998 May;97(18):1837-47.
37. Ngeh J, Anand V, Grupta S. Chlamydia pneumoniae and atherosclerosis--what we know and what we don't. *Clin Microbiol Infect.* 2002 Jan;8(1):2-13.
38. Hackam DG, Anand SS. Emerging risk factors for atherosclerotic vascular disease: a critical review of the evidence. *JAMA.* 2003 Aug;290(7):932-40.
39. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature.* 2002 Dec;420(6917):868-74.
40. Kinlay S, Libby P, Ganz P. Endothelial function and coronary artery disease. *Curr Opin Lipidol.* 2001 Aug;12(4):383-9.
41. Heinecke JW. Mechanisms of oxidative damage of low density lipoprotein in human atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 1997 Oct;8(5):268-74.
42. Steinberg D. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J Biol Chem.* 1997 Aug;272(34):20963-6.

43. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med*. 1989 Apr;320(14):915-24.
44. Steinbrecher UP, Parthasarathy S, Leake DS, Witztum JL, Steinberg D. Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degeneration of low density lipoprotein phospholipids. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984 Jun;81(12):3883-7.
45. Tedgui A, Mallat Z.. Atherosclerotic plaque formation. *Rev Prat*. 1999 Dec;49(19):2081-6.
46. Steinberg D. Atherogenesis in perspective: hypercholesterolemia and inflammation as partners in crime. *Nat Med*. 2002;8(11):1211-7.
47. Berliner JA, Heinecke JW. The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. *Free Radic Biol Med*. 1996;20(5):707-27.
48. Ylä-Herttuala S, Palinski W, Rosenfeld ME, Parthasarathy S, Carew TE, Butler S, et al. Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. *J Clin Invest*. 1989 Oct;84(4):1086-95.
49. Vaarala O, Alfthan G, Jauhiainen M, Leirisalo-Repo M, Aho K, Palosuo T. Crossreaction between antibodies to oxidised low-density lipoprotein and to cardiolipin in systemic lupus erythematosus. *Lancet*. 1993 Apr;341(8850):923-5.
50. Luz PL, Flavarato D. Doença coronária crônica. *Arq Bras Cardiol*. 1999;72(1):5-21.
51. Hulthe J, Fagerber B. Circulating oxidized LDL is associated with subclinical atherosclerosis development and inflammatory cytokines (AIR Study). *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002 Jul;22(7):1162-7.
52. Li H, Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr, Libby P. An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine-regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit aortic endothelium. *Arterioscler Thromb*. 1993 Feb;13(2):197-204.
53. Libby P, Sukhova G, Lee RT, Liao JK. Molecular biology of atherosclerosis. *Int J Cardiol*. 1997 Dec;62 Suppl 2:S23-9.

54. Kobayashi K, Kishi M, Atsumi T, Bertolaccini ML, Makino H, Sakairi N, et al. Circulating oxidized LDL forms complexes with beta2-glycoprotein I: implication as an atherogenic autoantigen. *J Lipid Res.* 2003 Apr;44(4):716-26.
55. Isner JM, Kearney M, Bortman S, Passeri J. Apoptosis in human atherosclerosis and restenosis. *Circulation.* 1995 Jun;91(11):2703-11.
56. Yang ZP, Kuo CC, Grayston JT. Systemic dissemination of *Chlamydia pneumoniae* following intranasal inoculation in mice. *J Infect Dis.* 1995 Mar;17(3):736-8.
57. Franck M, Staub HL, Petracco JB, Norman GL, Lassen AJ, Schiavo N, et al. Autoantibodies to the atheroma component beta2-glycoprotein I and risk of peripheral artery disease. *Angiology.* 2007 Jun-Jul;58(3):295-302.
58. Ranzolin A, Bohn JM, Norman GL, Manenti E, Bodanese LC, von Muhlen CA, Staub HL. Anti-beta2-glycoprotein I antibodies as risk factors for acute myocardial infarction. *Arq Bras Cardiol.* 2004 Aug;83(2):141-4.
59. Recuero ML, Silva JB, Norman GL, von Muhlen CA, Staub HL. IgA antibodies to beta2-glycoprotein I and carotid disease. *Isr Med Assoc J.* 2007 Jun;9(6):495-6.
60. Staub HL, Norman GL, Crowther T, da Cunha VR, Polanczyk A, Bohn JM, et al. Antibodies to the atherosclerotic plaque components beta2-glycoprotein I and heat-shock proteins as risk factors for acute cerebral ischemia. *Arq Neuropsiquiatr.* 2003 Set;61(3B):757-63.
61. Iverson GM, von Muhlen CA, Staub HL, Lassen AJ, Binder W, Norman GL. Patients with atherosclerosis syndrome, negative in anti-cardiolipin assay, make IgA autoantibodies that preferentially target domain 4 of beta(2)-GPI. *J Autoimmun.* 2006 dec;27(4):266-71.
62. Béchard D, Scherpereel A, Hammad H, Gentina T, Tsicopoulos A, Aumercier M, et al. Human endothelial-cell specific molecule-1 binds directly to the integrin CD11a/CD18 (LFA-1) and blocks binding to intercellular adhesion molecule-1. *J Immunol.* 2001 Sep;167(6):3099-106.
63. Igietsme JU, Ward ME. Chlamydia update. *Expert Rev Vaccines.* 2004 Dec;3(6):639-42.

64. Moulder JW. Interaction of Chlamydiae and host cells in vitro. *Microbiol Rev.* 1991 Mar;55(1):143-90.
65. Manavi K. A review on infection with Chlamydia trachomatis. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2006 Dec;20(6):941-51.
66. Everett KD, Bush RM, Andersen AA. Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *Int J Syst Bacteriol.* 1999 Apr;49 Pt2:415-40.
67. Stephens RS, Myers G, Eppinger M, Bavoil PM. Divergence without difference: phylogenetics and taxonomy of Chlamydia resolved. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2009 Mar;55(2):115-9.
68. Goh BT, Forster GE. Sexually transmitted disease in children: Chlamydia oculo-genital infection. *Genitourin Med.* 1993 Jun;69(3):213-21.
69. Mårdh PA. Influence on infection with Chlamydia trachomatis on pregnancy outcome, infant health and life-long sequelae in infected offspring. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2002 Dec;16(6):847-64.
70. Kroon FP, van 't Wout JW, Weiland HT, van Furth R. Chlamydia trachomatis pneumonia in an HIV-seropositive patient. *N Engl J Med.* 1989 Mar;320(12):806-7.
71. Muñoz Rodríguez FJ, Antonio Rebollo MT, Miret Mas C, López-Soto A. Chlamydia trachomatis pneumonia in the adult. *Med Clin (Barc.).* 1996 Dec;107(20):796-7.
72. Ward H, Martin I, Macdonald N, Alexander S, Simms I, Fenton K, et al. Lymphogranuloma venereum in the United Kingdom. *Clin Infect Dis.* 2007 Jan;44(1):26-32.
73. Dean D, Suchland RJ, Stamm WE. Evidence for long-term cervical persistence of Chlamydia trachomatis by omp1 genotyping. *J Infect Dis.* 2000 Set;182(3):909-16.
74. Sturm-Ramirez K, Brumblay H, Diop K, Guèye-Ndiaye A, Sankalé JL, Thior I, et al. Molecular epidemiology of genital Chlamydia trachomatis infection in high-risk women in Senegal, West Africa. *J Clin Microbiol.* 2000 Jan;38(1):138-145.

75. Somboonna N, Mead S, Liu J, Dean D. Discovering and differentiating new and emerging clonal populations of *Chlamydia trachomatis* with a novel shotgun cell culture harvest assay. *Emerg Infect Dis*. 2008 Mar;14(3):445-53.
76. Millman K, Black CM, Johnson RE, Stamm WE, Jones RB, Hook EW, et al. Population-based genetic and evolutionary analysis of *Chlamydia trachomatis* urogenital strain variation in the United States. *J Bacteriol*. 2004 Apr;186(8):2457-65.
77. Gaydos CA, Howell MR, Pare B, Clark KL, Ellis DA, Hendrix RM, et al. *Chlamydia trachomatis* Infections in female military recruits. *N Engl J Med*. 1998 Sep;339(11):739-44.
78. Kucinskiene V, Sutaite I, Valiukeviciene S, Milasauskiene Z, Domeika M. Prevalence and risk factors of genital *Chlamydia trachomatis* infection. *Medicina (Kaunas)* 2006;42(11):885-94.
79. Weinstock H, Dean D, Bolan G. *Chlamydia trachomatis* infections. *Infect Dis Clin North Am*. 1994 Dec;8(4):797-819.
80. Center For Disease Control and Prevention. Sexually transmitted disease Surveillance. 2007 [capturado em 2009 Out 06]. Disponível em: <http://www.cdc.gov/std/stats07/tables/1.htm>
81. Ministério da Saúde. DST em números. 2003 [capturado em 2008 Dez 12]. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/data/Pages/LUMISD1F318A3PTBRIE.htm>
82. Codes JS, Cohen DA, Melo NA, Santos AB, Codes JJG, Silva JJC, et al. Detecção de doenças sexualmente transmissíveis em clínica de planejamento familiar da rede pública do Brasil. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2002;24(2):101-6.
83. Ministério da Saúde. Secretaria de Projetos Especiais de Saúde. Coordenação de Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS. Manual de controle de DST. 1999 [capturado em 2008 Dez 12]. Disponível em: http://www.acemfc.org.br/modelo1/down/manual_controle_dst.pdf
84. Teles E, Hardy E, Oliveira UM, Christopher J, Faúdes E, Faúdes A. Reassessing risk assessment: limits to predicting reproductive tract infection in new contraceptive users. *Int Fam Plan Perspect*. [periódico online] 1997 Dec [capturado em 2008 Dez 12];23(4):179-82. Disponível em: <http://www.jstor.org/stable/2950843?origin=JSTOR-pdf>

85. Ramos MC, Becker D, Germany C, Sander MA, Stein A, Fagunder RAL, et al. Estudos populacionais de prevalência de *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae* pela relação da cadeia em polimerase em amostras de urina de mulheres residentes em vila popular na cidade de Porto Alegre, Brasil. *DST – J Bras Doenças Sex Transm.* 2003;15(2):20-5.
86. Miranda AE, Szwarcwald CL, Peres RL, Page-Shafer K. Prevalence and risk behaviors for *Chlamydia* infection in a population-based of female adolescents in Brazil. *Sex Transm Dis.* 2004 Sep;31(9):542-6.
87. Santos C, Teixeira F, Vicente A, Astolfi-Filho S. Detection of *Chlamydia trachomatis* in endocervical smears os sexually active women in Manaus-AM, Brazil, by PCR. *Braz J Infect Dis.*2003 Apr;7:91-5.
88. Black C. Current methods of laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections. *Clin Microbiol Rev.* 1997 Jan;10(1):160-84.
89. Dautry-Varsat A, Subtil A, Hackstadt T. Recent insights into the mechanisms of *Chlamydia* entry. *Cell Microbiol.* 2005 Dec;7(12):1714-22.
90. Hammerschlag MR. The intracellular life of chlamydiae. *Semin Pediatr Infect Dis.* 2002 Oct;13(4):239-48.
91. Debattista J, Timms P, Allan J, Allan J. Immunopathogenesis of *Chlamydia trachomatis* infections in women. *Fertil Steril.* 2003 Jun;79(6):1273-87.
92. Scidmore MA, Rockey DD, Fischer ER, Heinzen RA, Hackstadt T. Vesicular interactions of the *Chlamydia trachomatis* inclusion are determined by chlamydial early protein synthesis rather than route of entry. *Infect Immun.* 1996 Dec;64(12):5366-72.
93. Zhong G, Fan P, Ji H, Dong F, Huang Y. Identification of a chlamydial protease-like activity factor responsible for the degradation of host transcription factors. *J Exp Med.* 2001 Apr;193(8):935-42.
94. Fischer SF, Vier J, Kirschnek S, Klos A, Hess S, Ying S, et al. *Chlamydia* inhibit host cell apoptosis by degradation of proapoptotic BH3-only proteins. *J Exp Med.* 2004 Oct;200(7):905-16.

95. Miyairi I, Byrne GI. Chlamydia and programmed cell death. *Curr Opin Microbiol.* 2006 Feb;9(1):102-8.
96. Loomis WP, Starnbach MN. T cell responses to Chlamydia trachomatis. *Curr Opin Microbiol.* 2002 Feb;5(1):87-91.
97. Kinnunen A, Surcel HM, Halttunen M, Tiitinen A, Morrison RP, Morrison SG, et al. Chlamydia trachomatis heat shock protein-60 induced interferon gama and interleukin-10 production in fertile women. *Clin Exp Immunol.* 2003 Feb;131(2):299-303.
98. Kinnunen A, Molander P, Morrison R, Lehtinen M, Karttunen R, Tiitinen A, et al. Chlamydia heat shock protein 60-specific T cells is inflamed salpingeal tissue. *Fertil Steril.* 2002 Jan;77(1):162-6.
99. Bachmaier K, Neu N, de la Maza LM, Pal S, Hessel A, Penninger JM. Chlamydia infections and heart disease linked through antigenic mimicry. *Science.* 1999 Feb;283(5406):1335-9.
100. Fan Y, Wang S, Yang X. Chlamydia trachomatis (mouse pneumonitis strain) induces cardiovascular pathology following respiratory tract Infection. *Infect Immun.* 1999 Nov;67(11):6145-51.
101. Mavrogeni S, Manoussakis M, Spargias K, Kolovou G, Saroglou G, Cokkinos DV. Myocardial involvement in a patient with Chlamydia trachomatis infection. *J Card Fail.* 2008 May;14(4):351-3.
102. Kilic T, Jneid H, Ural E, Oner G, Sahin T, Kozdag G, et al. Impact of the metabolic syndrome on high-sensitivity C reactive protein levels in patients with acute coronary syndrome. *Atherosclerosis.* 2009 Jun:1-6. Epub 2009 Jun 11.
103. Yang ZP, Kuo CC, Grayston JT. Systemic dissemination of Chlamydia pneumoniae following intranasal inoculation in mice. *J Infect Dis.* 1995 Mar;171(3):736-8.
104. Kalman S, Mitchell W, Marathe R, Lammel C, Fan J, Hyman RW, et al. Comparative genomes of Chlamydia pneumoniae and C. trachomatis. *Nat Genet.* 1999;21(4):385-9.

105. Fryer RH, Schwobe EP, Woods ML, Rodgers GM. Chlamydia species infect human vascular endothelial cells and induce procoagulant activity. *J Invest Med.* 1997 Apr;45(4):168-74.
106. Krull M, Kramp J, Petrov T, Klucken AC, Hocke AC, Walter C, et al. Differences in cell activation by Chlamydia pneumoniae and Chlamydia trachomatis infection in human endothelial cells. *Infect Immun.* 2004 Nov;72(11):6615-21.
107. Layoglu MY, Byrne GI. Induction of macrophage foam cell formation by Chlamydia pneumoniae. *J Infect Dis.* 1998 Mar;177(3):725-9.
108. Kalayoglu MV, Hoerneman B, LaVerda D, Morrison SG, Morrison RP, Byrne GI. Cellular oxidation of low-density lipoprotein by Chlamydia pneumoniae. *J Infect Dis.* 1999 Sep;180(3):780-90.
109. Mousa A, Al-Zaki A, Taha S, Bakhiet M. Induction of interleukin-18 in atherosclerotic patients: a role for Chlamydia pneumoniae. *Med Princ Pract.* 2009 Feb;18(2):105-10. Epub 2009 Feb 9.
110. Baumert J, Schmidt KH, Eitner A, Straube E, Rödel J. Host cell cytokines induced by Chlamydia pneumoniae decrease the expression of interstitial collagens and fibronectin in fibroblasts. *Infect Immun.* 2009 Feb;77(2):867-76. Epub 2008 Dec 1.
111. Fryer RH, Schwobe EP, Woods ML, Rodgers GM. Chlamydia species infect human vascular endothelial cells and induce procoagulant activity. *J Invest Med.* 1997 Apr;45(4):168-74.
112. Danesh J, Whincup P, Walker M, Lennon L, Thomson A, Appleby P, et al. Low grade inflammation and coronary heart disease: prospective study and updated meta-analyses. *Br Med J.* 2000 Jul;321(7255):199-204.
113. Fernández-Real JM, Ricart W. Insulin resistance and chronic cardiovascular inflammatory syndrome. *Endocr Rev.* 2003 Jun;24(3):278-301.
114. Nabipour I, Vahdat K, Jafari SM, Pazoki R; Sandjdideh, Z. The association of metabolic syndrome and Chlamydia pneumoniae, Helicobacter pylori, cytomegalovirus, and herpes simplex type I: The Persian Gulf Healthy Heart Study. *Cardiovasc Diabetol.* 2006 Dec;5(25):1-6.

5 ARTIGO EM PORTUGUÊS

Anticorpos contra *Chlamydia trachomatis* e síndrome metabólica

Antibodies to *Chlamydia trachomatis* and metabolic syndrome

Luciele Sehnem¹, Luiz Carlos Bodanese², Giuseppe Repetto³, Henrique L. Staub⁴

Endereço para correspondência

Luciele Sehnem
Rua Osvaldo Aranha, 480/201
CEP: 96820-150
Santa Cruz do Sul – RS
Email: lucielesehnem@unisc.br

¹ Biomédica. Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde – Clínica Médica da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). Professora do Departamento de Enfermagem e Odontologia da Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC).

² Doutor em Cardiologia. Chefe do Serviço de Cardiologia do Hospital São Lucas da PUCRS. Professor Titular do Departamento de Medicina Interna da Faculdade de Medicina da PUCRS. Professor do Curso de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da PUCRS.

³ Médico com Ênfase em Endocrinologia, atuando principalmente nos seguintes temas: Obesidade, Diabete, Tireóide e Síndrome Metabólica. Professor Titular da PUCRS.

⁴ Doutor em Reumatologia e Mestre em Imunologia Clínica. Professor Adjunto de Reumatologia da Faculdade de Medicina PUCRS. Professor do Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina da PUCRS.

RESUMO

A síndrome metabólica (SM) compreende um conjunto de fatores de risco para doença aterosclerótica. Patógenos como *Chlamydia pneumoniae* e *Helicobacter pylori* podem estar envolvidos no deflagramento e perpetuação da aterogênese, mas sua relação com a SM é desconhecida. A exposição à *Chlamydia trachomatis* (CT) em pacientes com SM não foi explorada na literatura até o momento.

Objetivo: Avaliar a associação, se existente, entre anticorpos IgA e IgG anti-CT e ocorrência de SM.

Métodos: Neste estudo transversal, foram avaliados pacientes com SM com e sem eventos cardíacos prévios e controles sadios pareados por sexo e idade. O diagnóstico de SM se fundamentou nos critérios do NCEP. Anticorpos IgA e IgG anti-CT foram detectados por ensaio imunoenzimático; títulos acima de 1,1 unidades foram considerados positivos para ambos os isotipos. O teste do qui-quadrado foi utilizado para comparação das variáveis categóricas, e o teste t para comparação de variáveis contínuas. Para estimar a associação entre anticorpos anti-CT e SM, odds ratios (OR) foram calculados. Regressão logística foi utilizada para o ajuste das variáveis sexo e idade.

Resultados: O número total da amostra foi de 238 indivíduos: 101 pacientes (42,5%) com SM sem eventos cardíacos; 47 (19,7%) com SM e eventos cardíacos prévios; e 90 (37,8%) controles sadios. O sexo feminino predominou nos 3 grupos. A média global de idade foi 59,7 anos. A prevalência de teste positivo para IgA anti-CT foi maior em pacientes com SM (17%) do que em controles (6%) (P=0,015). Níveis elevados de IgA anti-CT se associaram significativamente com ocorrência de SM na comparação com controles sadios após ajuste para sexo e idade (OR=3,4; IC95% 1,2-9,4; P=0,015). Na análise de subgrupos, níveis elevados de IgA anti-CT foram mais prevalentes na SM não-complicada do que nos controles (P=0,013). Após ajuste para sexo a idade, a associação entre IgA anti-CT e SM não-complicada se manteve definida (OR=3,6; IC95% 1,32-10,2; P=0,015).

Conclusões: Anticorpos IgA anti-CT, possivelmente de fase aguda, foram mais prevalentes na SM do que em controles sadios. Um teste positivo para IgA anti-CT se associou particularmente à ocorrência de SM não-complicada. O papel da resposta IgA anti-CT em pacientes com SM deve ser detalhado em estudos futuros.

Palavras-chaves: síndrome metabólica, *Chlamydia trachomatis*, doenças cardiovasculares.

ABSTRACT

The metabolic syndrome (MS) comprises a cluster of risk factors for atherosclerotic disease. Pathogens such as *Chlamydia pneumoniae* and *Helicobacter pylori* may be involved on triggering and perpetuation of atherogenesis, but their relationship with MS is rather unknown. Exposition to *Chlamydia trachomatis* (CT) in patients with MS has been unexplored in the literature up to date.

Objective: to evaluate the association, if any, of IgA and IgG anti-CT antibodies and occurrence of MS.

Methods: in this cross-sectional study, patients with MS with and without previous cardiovascular disease and age and age and sex-matched controls were evaluated. MS diagnosis was based on NCEP criteria. IgA and IgG anti-CT antibodies were detected by immunoenzymatic assay; titers above 1.1 units were considered as positive. The chi-squared test was utilized for comparison of categoric variables, and the t test for continuous variables. To estimate the association of anti-CT antibodies and MS, odds ratios were calculated. Logistic regression was utilized for adjustment of age and sex.

Results. The total survey included 238 individuals: 101 patients (42.5%) with MS without cardiac events; 47 (19.7%) with MS and previous cardiac events; and 90 (37.8%) healthy controls. Females predominated in the 3 groups of patients. The global mean age was 59.7 years. The prevalence of a positive test for IgA anti-CT was higher in patients with MS (17%) than in controls (6%) ($P=0.015$). Elevated levels of IgA anti-CT associated significantly with occurrence of MS in comparison to healthy controls after adjustment for sex and age ($OR=3.4$; $CI_{95\%} 1.2-9.4$; $P=0.015$). In the subgroup analysis, elevated levels of IgA anti-CT were more prevalent in non-complicated MS than in controls ($P=0.013$). After adjustment for age and sex, the association of IgA anti-CT with non-complicated MS remained defined ($OR=3.6$; $CI_{95\%} 1.32-10.2$; $P=0.015$).

Conclusions: IgA anti-CT antibodies, possibly of acute phase, were more prevalent in MS than in healthy controls. A positive test for IgA anti-CT associated particularly to non-complicated MS. The role of such IgA response in patients with MS should be detailed in forecoming studies.

Key words: metabolic syndrome, *Chlamydia trachomatis*, cardiovascular disease.

Introdução

A síndrome metabólica (SM) compreende uma combinação de obesidade abdominal, hipertensão arterial e anormalidades do metabolismo glicolípídico. O *National Cholesterol Education Programme Adult Treatment Panel III* (NCEP ATP III) considera a SM como um estado pró-inflamatório e pró-trombótico que culmina com doenças cardiovasculares. Assim, a SM é considerada uma entidade pró-aterogênica. A prevalência de SM nos Estados Unidos da América está estimada em 24% da população adulta¹⁻³. A associação entre SM e doença cardiovascular (particularmente em homens) foi confirmada por Lakka *et al* (2002)⁴.

A SM se notabiliza por gerar uma resposta inflamatória crônica⁵. Sabidamente, adipócitos de pacientes com SM sintetizam citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral (TNF) e interleucina 6 (IL-6); estas, por sua vez, estimulam a produção de proteína-C reativa (PCR) pelos hepatócitos⁶⁻⁹.

A inflamação intravascular participa de forma relevante no deflagramento da aterogênese. Há indícios de que agentes infecciosos podem predispor ao desenvolvimento de aterosclerose e eventos cardiovasculares. A exposição a patógenos como herpes virus tipo 1, vírus da hepatite A, B e C, citomegalovírus, *Helicobacter pylori* e *Chlamydia pneumoniae* poderia estar envolvida com o deflagramento de doença aterosclerótica¹⁰⁻¹³. A infecção murina pela *Chlamydia pneumoniae* de subtipo AR39 exacerbou significativamente a ateromatose aórtica na presença de hipercolesterolemia¹⁴.

Proteínas de choque térmico (Hsp) originárias de patógenos como *Chlamydia pneumoniae* são consideravelmente homólogas à Hsp endoteliais de 60 kilodaltons (kDa). Hsp endoteliais, por sua vez, participam diretamente da aterogênese ao estimular a migração de células musculares lisas para a camada íntima e ativarem monócitos. Anticorpos cruzados anti-Hsp poderiam acelerar o dano endotelial autoimune¹⁵.

Um eventual efeito pró-aterogênico atribuível à exposição a bactérias gram-negativas do gênero *Chlamydia* ainda está distante de uma compreensão mais clara^{16,17}. *Chlamydias* são patógenos intracelulares obrigatórios, com ciclo de vida bifásico. No meio extracelular, seus corpos elementares podem ativar o sistema macrofágico e linfocitário, com consequente liberação de citocinas pró-inflamatórias como TNF e interferon-gama¹⁸.

A *Chlamydia trachomatis* (CT), de transmissão predominantemente sexual, pode causar infecções oculares como o tracoma e infecções urogenitais¹⁹. Por sua vez, a exposição à *Chlamydia pneumoniae* causa infecções de tropismo respiratório. A análise comparativa dos

genomas das duas espécies revela que 214 sequências pré-protêicas da *Chlamydia pneumoniae* não são encontradas no genoma da CT, o que poderia explicar o diferente comportamento biológico das duas espécies²⁰.

Há indícios de que a *Chlamydia pneumoniae* pode infectar células endoteliais, musculares lisas, macrófagos e linfócitos, todas envolvidas na aterogênese²¹. De importância, CT de subtipos H e L também infectam células endoteliais humanas em cultura; a exposição endotelial a estas espécies de *Chlamydia* induz um estado pró-coagulante manifesto por hiperexpressão de fator tecidual²². Outros autores, embora confirmassem infecção de células endoteliais por CT, não observaram síntese de IL-8 e adesinas por parte do endotélio nesta circunstância, diferentemente do que ocorria quando da exposição à *Chlamydia pneumoniae*²³.

Uma eventual participação das bactérias do gênero *Chlamydia* no processo aterogênico é bastante polêmica. É possível que estas bactérias se associem a fenômenos autoimunes intravasculares via expressão de Hsp homólogas às endoteliais, é possível. Um efeito direto destes patógenos na parede endotelial também não pode ser descartado.

A maioria dos estudos que endereçaram o binômio CT-dano vascular são fundamentados em modelos animais, ou série de casos. São poucos os estudos observacionais que avaliaram exposição à CT em pacientes com doença aterosclerótica. Na SM, foco principal do presente estudo, o papel da infecção por CT ainda não foi analisado. A SM, como entidade pró-inflamatória e pró-trombótica²⁴, nos parece apropriada para o estudo da relação CT-vasculopatia.

Neste contexto, é nosso objetivo avaliar a prevalência de anticorpos de fase aguda (IgA) e de anticorpos de memória (IgG) contra CT em pacientes metabólicos com e sem eventos cardiovasculares prévios. Esta dicotomização de pacientes com SM poderá nos permitir conclusões mais detalhadas acerca do papel da CT neste contexto. Em paralelo, avaliaremos se um teste positivo para IgA ou IgG anti-CT se associa à ocorrência de SM.

Materiais e Métodos

População

O estudo, transversal controlado, incluiu indivíduos com SM em acompanhamento no Ambulatório de Risco Cardiometabólico do Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – PUCRS (HSL-PUCRS). A amostra foi selecionada independentemente de sexo ou raça. A amostra foi dividida em três grupos: pacientes com SM sem eventos cardíacos, pacientes com SM com evento cardíaco prévio (infarto agudo do miocárdio, síndrome coronariana aguda, histórico de cirurgia de revascularização miocárdica) e controles. A confirmação de eventos cardíacos foi obtida através de verificação dos prontuários médicos.

Para diagnóstico de SM, foram seguidos os critérios clássicos do NCEP²⁵, onde no mínimo três das características abaixo estavam presentes: circunferência abdominal ≥ 102 cm se homens ou ≥ 88 cm se mulheres; níveis séricos de triglicerídeos ≥ 150 mg/dl; níveis séricos da lipoproteína de alta densidade (HDL) de colesterol < 40 mg/dl se homens ou < 50 mg/dl se mulheres; pressão arterial $\geq 130/85$ mmHg; glicemia de jejum ≥ 100 mg/dl.

O grupo de controles, pareado por sexo e idade, foi selecionado do banco de sangue do Hospital São Lucas (HSL) da PUCRS. Os controles foram testados no Laboratório de Patologia do HSL da PUCRS para HDL, glicose, e triglicerídeos, além dos exames imunológicos de rotina (anti-HIV 1/2, anti-HCV, anti-HTLV, Chagas, VDRL, HbsAg e anti-Hbc). Foram excluídos deste grupo indivíduos que apresentaram três ou mais critérios diagnósticos para SM de acordo com o NCEP²⁵. Os dados clínicos e demográficos foram obtidos mediante preenchimento de ficha cadastral durante entrevista com os doadores ou familiares, sendo consideradas as seguintes características: idade, sexo e história de doença arterial coronariana. Todos os indivíduos do estudo concordaram em participar da pesquisa mediante a apresentação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Sorologia

As amostras de sangue (5 ml) foram coletadas por veia periférica, centrifugadas para obtenção do soro e congeladas até 2 horas após a coleta; foram, então, armazenadas à temperatura de -70°C para posterior testagem imunoenzimática.

As sorologias foram efetuadas no Laboratório de Imunologia do HSL-PUCRS. Anticorpos de isotipos IgA e IgG contra *Chlamydia trachomatis* foram avaliados por ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizando-se o kit comercial *Chlamydia trachomatis* IgA e IgG -

SYM da empresa ALKA[®] – Tecnologia em Diagnóstico, São Paulo, Brasil. O antígeno da CT acoplado à fase sólida da placa consistiu na proteína externa de membrana. O lipopolissacarídeo responsável pela maior parte das reações cruzadas com outras espécies de *Chlamydia* não foi incluído na microplaca. Sucintamente, 5 µl do soro do paciente e dos controles positivo e negativo (em duplicata) foram colocados nos poços da microplaca e diluídos em 100 µl de diluente das amostras contendo um tampão fosfato com estabilizante de proteínas. Na sequência, a placa foi incubada em estufa a 37°C por 45 minutos. A microplaca foi então submetida a 5 lavagens, nas quais anticorpos inespecíficos foram eliminados. A seguir, 100 µl do conjugado enzimático (solução de anti-IgA ou anti-IgG humanas conjugadas com peroxidase) foram adicionados em todos os poços da microplaca; a placa foi então novamente incubada a 37°C por 30 minutos. Após cinco lavagens, 100 µl de substrato incolor foram colocados em todos os poços. A microplaca foi então incubada no escuro em temperatura ambiente por 20 minutos. Cinquenta µl da solução de parada foi adicionada. Os resultados foram obtidos, após validação do teste, conforme a absorbância das amostras, avaliadas por espectrofotometria com comprimento de onda de 450/620nm. A intensidade de coloração obtida com as amostras de pacientes com SM foi comparada com aquela dos controles. Títulos foram considerados positivos quando acima de 1,1 unidades para os dois isotipos e negativos quando abaixo de 0,9 unidades para ambos isotipos^{26,27}.

Métodos estatísticos

O intervalo de confiança (IC) baseado na distribuição binomial foi usado na análise de proporção. O teste do qui-quadrado foi utilizado para comparação das variáveis categóricas, e o teste t de student para comparação de variáveis contínuas. Para estimar o grau de associação entre anticorpos anti-CT e desfecho SM, odds ratios (OR) com intervalo de confiança de 95% (IC95%) foram calculados. Para o ajuste dos fatores de confusão (sexo e idade), utilizou-se regressão logística. Os dados foram analisados com o auxílio do programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) para *Windows*, versão 11.5, *Chicago, IL*.

Considerações Éticas

O projeto de pesquisa deste estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da PUCRS, e aprovado em 07 de agosto de 2009, sob o registro OF.CEP-1008/09.

Resultados

A amostra global do estudo foi de 238 indivíduos (72,3% mulheres, $P < 0,0001$). Cento e um pacientes compuseram o grupo de SM sem eventos cardíacos prévios (SMsE); 47 pacientes apresentavam SM e eventos cardíacos prévios (SMcE) e 90 indivíduos compuseram o grupo de controles sadios. O sexo feminino predominou nos 2 grupos com SM, e este dado não foi significativo na comparação com controles sadios. A média global de idade foi de 59,7 ($\pm 9,9$ DP); em pacientes com SM como um todo, a média etária foi de 60,2 anos. Não houve diferença significativa na média de idade entre os grupos de pacientes com SM e controles. Estes dados estão sumarizados na [tabela 1](#).

Tabela 1. Dados demográficos da amostra.

	Total (n=238)	Mulheres (n=172)	Média de Idade			
	N	N	P*	Anos	\pm DP	P**
SMsE	101 (42,5%)	78 (78,2%)	0,34	58,9	9,9	0,64
SMcE	47 (19,7%)	28 (59,6%)	0,13	61,6	8,5	0,36
Controles	90 (37,8%)	65 (72,2%)		59,6	10,6	

n/N: número amostral; DP: desvio padrão; SMsE: SM sem eventos cardíacos; SMcE: SM com evento cardíaco; *Teste do qui-quadrado, comparado a controles; **Teste t de Student, comparado a controles.

A prevalência de IgA e IgG anti-CT, assim como a associação entre estes anticorpos e SM após ajuste para sexo e idade por regressão logística, é mostrada na [tabela 2](#). Níveis elevados de IgA anti-CT foram consideravelmente mais detectados em pacientes com SM do

que em controles sadios. A ocorrência de teste positivo para IgA anti-CT se associou de forma significativa com SM.

Tabela 2. Associação entre anticorpos IgA e IgG anti-CT e SM.

	Com SM (n=148)	Controles (n=90)	OR*	IC95%	P**
IgA anti-CT	17,0%	6,0%	3,4	1,2-9,4	0,015
IgG anti-CT	4,1%	2,2%	1,8	0,4-9,5	0,45

CT: *Chlamydia trachomatis*; SM: síndrome metabólica, n: número absoluto; OR*: odds ratio ajustado para sexo e idade; IC95%: intervalo de confiança de 95%; **Teste do qui-quadrado.

A frequência de positividade para anticorpos anti-CT foi comparada nos 3 grupos de indivíduos ([tabela 3](#)). A frequência de teste positivo para IgA anti-CT foi significativa em pacientes com SMsE em relação aos controles sadios; não houve diferença significativa nas demais comparações entre os três grupos.

Tabela 3. Prevalência de anticorpos IgA e IgG anti-CT em indivíduos com SM (com e sem eventos cardíacos) e controles.

	SMsE (n=101)	Controles (n=90)	P*	SMcE (n=47)	Controles (n=90)	P*	SMsE (n=101)	SMcE (n=47)	P*
IgA anti- CT	18%	6%	0,013	15%	6%	0,11	18%	15%	0,81
IgG anti- CT	3%	2,2%	0,99	6,4%	2,2%	0,34	3%	6,4%	0,39

CT: *Chlamydia trachomatis*; SM: síndrome metabólica; SMsE: SM sem eventos cardíacos, SMcE: SM com eventos cardíacos; * Teste do qui-quadrado.

Após ajuste para sexo e idade em modelo de regressão logística, OR foram obtidos para anticorpos IgG e IgA anti-CT nas diversas comparações entre os três grupos de indivíduos. O efeito destes ajustes por regressão logística no OR pode ser visto na [tabela 4](#). Um teste positivo para IgA anti-CT se associou de forma significativa com a ocorrência de SMsE quando estes foram comparados com controles sadios. A associação envolvendo IgA anti-CT não se confirmou quando indivíduos com SMcE foram comparados com controles sadios, ou quando os 2 grupos de pacientes com SM foram comparados entre si. A ocorrência de teste positivo para IgG anti-CT não se associou com SM em nenhuma das combinações testadas.

Tabela 4. Odds ratios ajustados para IgA e IgG anti-CT nos diferentes grupos.

	OR*	IC95%	P
IgA anti-CT: SMsE x controles	3,6	1,32-10,2	0,015
IgG anti-CT: SMsE x controles	1,2	0,2-7,5	0,82
IgA anti-CT: SMcE x controles	3,1	0,9-10,9	0,06
IgG anti-CT: SMcE x controles	3,6	0,5-22,0	0,17
IgA anti-CT: SMcE x SMsE	1,2	0,05-1,7	0,19
IgG anti-CT: SMcE x SMsE	0,32	0,45-3,2	0,69

CT: *Chlamydia trachomatis*; OR* ajustado para sexo e idade em modelo de regressão logística; IC95%: intervalo de confiança de 95%; SMsE: SM sem eventos cardíacos; SMcE: SM com eventos cardíacos.

Discussão

O papel de patógenos no processo de aterogênese é motivo de grande polêmica na comunidade científica nos últimos anos²⁸. A relação entre SM, entidade pró-aterogênica, e agentes infecciosos foi pouco estudada até o momento; é possível que patógenos contribuam direta ou indiretamente para a formação do ateroma²⁹. Sabidamente, micro-organismos do gênero *Chlamydia*, incluindo a CT, podem infectar células endoteliais^{22,23}.

Nosso estudo avaliou a frequência de anticorpos IgA e IgG anti-CT em pacientes com SM. Um subgrupo de nossos pacientes se encontrava em situação pré-aterosclerótica (SM não-complicada), enquanto o outro subgrupo apresentava histórico cardiovascular. Esta estratificação de pacientes com SM nos permitiu algumas hipóteses de interesse. Em paralelo, averiguamos a associação entre teste positivo para anticorpos anti-CT e ocorrência de SM.

A casuística global do estudo incluiu 238 indivíduos (dois terços do sexo feminino). Houve predomínio de mulheres em ambos os grupos de pacientes com SM (não-complicada e com histórico cardiovascular). Os controles foram pareados por sexo. Um predomínio de sexo em pacientes com SM não está definido na literatura; a SM pode prevalecer no sexo masculino³⁰, ocorrer indistintamente nos dois sexos³¹ ou, como em nosso estudo, predominar no sexo feminino³². Estes achados discrepantes podem se explicar pela seleção das amostras e delineamento dos estudos³⁰⁻³².

A média de idade de nossa amostra global se situou em torno de 59 anos (ao redor de 60 anos no grupo de SM). O grupo de controles foi pareado por idade, o que implicou em

equidade na distribuição das médias etárias em indivíduos com SM e controles. A faixa etária média de nossos pacientes com SM está de acordo com dados de outros estudos^{32,33}. A ocorrência de SM foi maior entre 55 e 64 anos de idade e aumentou com a idade, de acordo com estudo latino-americano¹.

Considerando-se a população total de pacientes com SM em comparação a controles sadios, níveis elevados de IgA (mas não de IgG) anti-CT foram consideravelmente mais frequentes na população-alvo. O OR obtido após ajuste para sexo e idade (3,4; IC95% 1,2-9,4; P=0,015) foi indicativo de associação entre teste positivo para IgA anti-CT e SM. Em outro raro estudo envolvendo agentes infecciosos e SM, IgG anti-*Chlamydia pneumoniae* se associou de forma significativa com SM em uma população iraniana; anticorpos anti-CT não foram avaliados¹².

Nossos dados indicaram que um teste positivo para IgA anti-CT foi mais prevalente na população de pacientes com SM não-complicada do que em controles sadios (P=0,013). Quando comparamos pacientes com SM complicada e controles, não houve diferença significativa na positividade para IgA CT; infere-se, assim, que a associação global entre IgA anti-CT e SM se fundamentou na maior positividade do subgrupo de pacientes não-complicados.

Após ajustes para sexo e idade, verificamos que um teste positivo para IgA anti-CT se associou de forma significativa com SM não-complicada na comparação com controles sadios (OR=3,6; IC95% 1,32-10,2; P=0,015). O mesmo não ocorreu quando pacientes com SM associada a eventos prévios foi comparada a controles, ou quando as duas populações metabólicas foram mutuamente comparadas. De interesse, um teste positivo para IgG anti-CT não se associou à ocorrência de nenhum dos dois subgrupos de SM.

Nossa opção de testar o isotipo IgA como anticorpo presumivelmente de fase aguda se fundamenta no tropismo da CT pelas mucosas. Dados recentes corroboram a utilização da testagem para IgA anti-CT em infecções urogenitais^{34,35}. Embora a acuidade dos métodos sorológicos (imunofluorescência indireta, ensaio imunoenzimático) para detecção anticorpos anti-CT seja motivo de debate, a sorologia ainda é preferencial a outros métodos nesta circunstância³⁶. Optamos pelo método imunoenzimático dada à disponibilidade deste ensaio em nosso Hospital.

A exacerbada resposta IgA anti-CT vista em nossos pacientes com SM não foi previamente descrita na literatura. Tal resposta anticórpica pode estar refletindo uma exposição de fase aguda ao patógeno. Isotipos de memória (IgG) não foram detectados de

maneira significativa em nossos pacientes com SM, o que, teoricamente, aumentaria a possibilidade de uma resposta IgA recente nestes indivíduos.

As razões pela quais a resposta IgA anti-CT predominou em nossos pacientes com SM não-complicada são enigmáticas. Como hipótese, podemos postular que o “gatilho” infeccioso que gera a resposta IgA pode estar seletivamente presente antes do evento, tendendo a desaparecer após o episódio isquêmico. Os motivos por que a resposta IgA se torna indetectável em pacientes com eventos cardíacos são também desconhecidos, mas poderiam incluir o clareamento do complexo IgA-CT por macrófagos durante ou logo após o evento isquêmico, ou ainda a incapacidade de geração de resposta humoral pós-evento isquêmico.

Um papel etiopatogênico para agentes infecciosos na doença aterosclerótica estabelecida tem sido postulado, mas os mecanismos intrínsecos desta relação são desconhecidos^{35,37-39}. Os agentes comumente associados à aterosclerose incluem *Chlamydia pneumoniae*^{40,41}, *Helicobacter pylori*^{41,42}, citomegalovírus^{43,44}, herpes vírus^{45,46} e vírus de hepatite A, B e C⁴⁷⁻⁴⁹. Em contraste, outros autores reportaram ausência de associação entre doença aterosclerótica e exposição à *Chlamydia pneumoniae*^{50,51}, *Helicobacter pylori*^{50,52}, citomegalovírus^{42,50}, herpes vírus⁵¹ ou vírus de hepatite⁵³⁻⁵⁵. Infecção por *Chlamydia pneumoniae* poder ser considerada um fator contributivo para aterogênese, mas não um fator de risco independente para doença aterosclerótica⁵⁶.

Nosso subgrupo de pacientes com SM e eventos cardíacos prévios compreende, conceitualmente, indivíduos com aterosclerose estabelecida. Nesta subpopulação específica, a prevalência de IgA e IgG anti-CT não foi aumentada em relação a controles, e um teste positivo para os dois isotipos não se associou ao desfecho. Há uma chamativa escassez de literatura acerca da associação entre anticorpos anti-CT e doença aterosclerótica estabelecida.

A exposição murina à CT foi capaz de deflagrar infecção respiratória e posterior doença cardiovascular⁵⁷. O metabolismo da fosfatidilcolina derivada da lipoproteína de baixa densidade (LDL) é acelerado na presença de infecção por CT⁵⁸. Digno de nota, a exposição nasal à *Chlamydia pneumoniae* de murinos deficientes em apolipoproteína E acelerou a ateromatose da aorta; quando os animais foram inoculados com CT, as alterações inflamatórias na aorta foram leves e transitórias⁵⁹. Mavrogeni *et al* (2008) documentaram a presença de miocardiopatia em paciente infectado por CT e com histórico de prostatites recorrentes⁶⁰.

Um mecanismo de mímica molecular é plausível para explicar a possível patogenicidade de anticorpos anti-CT em pacientes com SM e ateromatose. Neste contexto,

proteínas de 60 kDa da membrana externa (provavelmente Hsp) de várias espécies de *Chlamydia* mimetizam sequências peptídicas da miosina cardíaca; a imunização de murinos com este peptídeo induziu miocardiopatia, provavelmente por resposta humoral cruzada⁶¹.

A detecção de Hsp60 na superfície de células endoteliais ativadas foi recentemente confirmada por microscopia focal⁶². Hsp60 derivada de *Chlamydia*, assim como Hsp60 humana, são capazes de ativar células endoteliais, células musculares lisas e macrófagos⁶³. Uma resposta humoral anti-Hsp60 pode ser citotóxica para o endotélio, de acordo com dados de 1995⁶⁴. Anticorpos anti-Hsp60 podem estimular síntese de citocinas pró-inflamatórias pelo endotélio, e níveis altos deste anticorpo se associaram com a gravidade do processo aterosclerótico⁶⁵. Em homens com doença coronária, além de respostas IgA e IgG anti-*Chlamydia pneumoniae* exacerbadas, uma marcante resposta celular a antígenos de CT foi documentada⁶⁶.

É admissível que a resposta anticórpica IgA observada em nossos pacientes com SM reflita uma atividade humoral contra Hsp de CT e, por homologia molecular, também contra Hsp60 endotelial. De fato, dados recentes indicam que em pacientes com infecção persistente por CT, autoimunidade e aterogênese podem advir em decorrência de uma resposta anticórpica dirigida contra a Hsp60 endotelial. Em contrapartida, células tumorais expressando Hsp60 de superfície podem ser lisadas por anticorpos cruzados; nesta última circunstância, em pacientes expostos à CT uma resposta anti-Hsp cruzada poderia ser protetora para neoplasias⁶⁷.

Nosso grupo de pesquisa avaliou, em anos recentes, uma eventual associação entre anticorpos IgG contra Hsp60 humana e Hsp65 micobacteriana e doença aterosclerótica. Níveis elevados de anti-Hsp60 se associaram de forma definida e independente com doença arterial periférica⁶⁸. Anticorpos anti-Hsp60 e anti-Hsp65 se associaram, também de forma independente, com doença isquêmica cerebral aguda⁶⁹, mas não com infarto agudo do miocárdio⁷⁰. Outros autores confirmaram uma associação independente de anticorpos anti-Hsp65 com acidente vascular cerebral isquêmico⁷¹ e doença obstrutiva de carótidas^{72,73}.

Ainda de interesse, outras proteínas componentes da CT que não Hsp podem mimetizar proteínas humanas e serem alvos de anticorpos cruzados: é o caso da DNA primase da CT⁷⁴.

A relação entre anticorpos anti-CT, SM e aterosclerose necessita estudos mais aprofundados. Para o momento, os dados são insuficientes para que se definam implicações diagnósticas e terapêuticas. Referente ao binômio *Chlamydia pneumoniae*-doença

aterosclerótica, não abordado neste estudo, anticorpos IgA contra este patógeno se associaram à ocorrência de estenose coronária de acordo com dois estudos^{75,76}.

Os dados acerca da antibioticoterapia para *Chlamydia pneumoniae* em pacientes com doença aterosclerótica estabelecida são conflitantes. Antibioticoterapia por 12 semanas reduziu em 36% os eventos cardíacos de pacientes com síndromes coronárias agudas após 1 ano de observação⁷⁷.

Em outro estudo, o efeito da antibioticoterapia com macrolídeo foi fugaz em pacientes com angina pectoris⁷⁸. Na doença arterial periférica, o uso de rifalazil, potente droga anti-*Chlamydia pneumoniae*, não modificou a qualidade de vida dos pacientes quando comparado a controles⁷⁹. Dados acerca de um eventual tratamento para infecção por CT em pacientes com SM ou doença aterosclerótica, no momento inexistentes, são esperados para o futuro.

Limitações do estudo

Embora os resultados comparativos indiquem que níveis elevados de IgA anti-CT sejam mais frequentes na SM do que em controles sadios, devemos enfatizar que a prevalência global de teste positivo para este anticorpo foi relativamente pequena (17%). Além disso, a positividade do teste em controles sadios não foi desprezível (6%). Embora o número total de controles não tenha sido propriamente pequeno, foi menor do que o número global de pacientes com SM, e esta é certamente uma das limitações de nosso estudo. Na análise de subgrupos de pacientes com SM, a diferença numérica em relação aos controles praticamente desaparece, entretanto.

Mesmo que os indivíduos de nosso grupo-controle não preenchessem os critérios clássicos para SM, a eventual ocorrência de estigmas isolados de SM nestes indivíduos compreende outra limitação de nosso estudo. A não obtenção de dados referentes à raça nos controles inviabilizou o ajuste para esta variável na análise estatística.

Por fim, admitimos que se tivéssemos oportunizado a testagem combinada de anticorpos anti-CT e anticorpos contra Hsp60 (humana e/ou de *Chlamydia*), teríamos obtido dados de interesse na interpretação desta intrigante resposta IgA anti-CT vista na SM. Novos estudos se fazem necessários para esclarecer o papel etiopatogênico da resposta IgA anti-CT nestes indivíduos.

Conclusões

I) A prevalência de anticorpos IgA, mas não de IgG, anti-CT foi significativamente maior em pacientes com SM do que em controles sadios pareados por sexo e idade;

II) A ocorrência de anticorpos IgA anti-CT se associou à presença de SM como um todo;

III) A resposta IgA anti-CT, presumivelmente de fase aguda, predominou em pacientes com síndrome metabólica não-complicada em comparação a controles sadios;

IV) Um teste positivo para IgA anti-CT se associou à presença de SM não-complicada, independentemente de sexo e idade.

Referências

1. Escobedo J, Schargrotsky H, Champagne B, Silva H, Boissonnet CP, Vinueza R, et al. Prevalence of the Metabolic syndrome in Latin America and its association with sub-clinical carotid atherosclerosis: the CARMELA cross sectional study. *Cardiovas Diabetol*. 2009;8:1-9.
2. Kraja AT, Province MA, Arnett D, Wagenknecht L, Tang W, Hopkins PN, et al. Do inflammation and procoagulation biomarkers contribute to the metabolic syndrome cluster? *Nutr Metab (Lond)*. 2007;4:1-12.
3. Malik S, Wong ND, Franklin SS, Kamath TV, L'Italien GJ, Pio JR, et al. Impact of the metabolic syndrome on mortality from coronary heart disease, cardiovascular disease, and all causes in united states adults. *Circulation*. 2004;110:1245-50.
4. Lakka HM, Laaksonen DM, Lakka TA, Niskanen LK, Kumpusalo E, Tuomilehto J, et al. The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. *JAMA*. 2002;288:2709-16.
5. Kerner A, Avizohar O, Sella R, Bartha P, Zinder O, Markiewicz W, et al. Association between elevated liver enzymes and C-reactive protein. Possible hepatic contribution to systemic inflammation in the metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:193-7.

6. Hassinen M, Lakka TA, Komulainen P, Gylling H, Nissinen A, Rauramaa R. C-reactive protein and metabolic syndrome in elderly women. A 12-year follow-up study. *Diabetes Care*. 2006;29:931-2.
7. Ishikawa S, Kayaba K, Gotoh T, Nakamura Y, Kajii E. Metabolic syndrome and C-reactive protein in the general population. JMS cohort study. *Circ J*. 2007;71:26-31.
8. Nishida M, Moriyama T, Ishii K, Takashima S, Yoshizaki K, Sugita Y, et al. Effects of IL-6, adiponectin, CRP and metabolic syndrome on subclinical atherosclerosis. *Clin Chim Acta*. 2007;384:99-104.
9. Picchi A, Gao x, Belmadani S, Potter BJ, Focardi M, Chilian WM, et al. Tumor necrosis factor-alpha induces endothelial dysfunction in the prediabetic metabolic syndrome. *Circ Res*. 2006;99:69-77.
10. Campbell LA, Nosaka T, Rosenfeld ME, Yaraei K, Kuo CC. Tumor necrosis factor alpha plays a role in the acceleration of atherosclerosis by Chlamydia pneumoniae in mice. *Infect Immun*. 2005;73:3164-5.
11. Morré SA, Stooker W, Lagrand WK, van den Brule AJC, Niessen HWM. Microorganisms in the aetiology of atherosclerosis. *J Clin Pathol*. 2000;53:647-54.
12. Nabipour IVK, Jafari SM, Pazoki R, Sandjdideh Z. The association of metabolic syndrome and Chlamydia pneumoniae, Helicobacter pylori, cytomegalovirus, and herpes simplex type I: The Persian Gulf Healthy Heart Study. *Cardiovasc Diabetol*. 2006;5:1-6.
13. Stassen FR, Vainas T, Bruggeman CA. Infection and atherosclerosis. An alternative view on an outdated hypothesis. *Pharmacol Rep*. 2008;60:85-92.
14. Hu H, Pierce G, Zhong G. The atherogenic effects of chlamydia are dependent on serum cholesterol and specific to Chlamydia pneumoniae. *J Clin Invest*. 1999;103:747-53.
15. Mayr M, Metzler B, Kiechl S, Willet J, Schett G, Xu Q, et al. Endothelial cytotoxicity mediated by serum antibodies to heat shock proteins of Escherichia coli and Chlamydia pneumoniae: immune reactions to heat shock proteins as a possible link between infection and atherosclerosis. *Circulation*. 1999;99:1560-6.

16. de Kruif MD, van Gorpa EC, Kellera TT, Ossewaardec JM, ten Cate H. Chlamydia pneumoniae infections in mouse models: relevance for atherosclerosis research. *Cardiovasc Res.* 2005;65:317-27.
17. Laurila A, Bloigu A, Näyhä S, Hassi J, Leinonen M, Saikku P. Chronic Chlamydia pneumoniae infection is associated with a serum lipid profile known to be a risk factor for atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:2910-3.
18. Loomis WP, Starnbach MN. T cell responses to Chlamydia trachomatis. *Curr Opin Microbiol.* 2002;5:87-91.
19. Goh BT, Forster GE. Sexually transmitted diseases in children: chlamydial oculo-genital infection. *Genitourin Med.* 1993;69:213-21.
20. Kalman S, Mitchell W, Marathe R, Lammel CJ, Fan T, Hyman RW, et al. Comparative genomes of Chlamydia pneumoniae and C. trachomatis. *Nat Genet.* 1999;21:385-9.
21. Yang ZP, Kuo CC, Grayston JT. Systemic dissemination of Chlamydia pneumoniae following intranasal inoculation in mice. *J Infect Dis.* 1995;171:736-8.
22. Fryer RH, Schwobe EP, Woods ML, Rodgers GM. Chlamydia species infect human vascular endothelial cells and induce procoagulant activity. *J Investig Med.* 1997;45:168-74.
23. Krull M, Kramp J, Klucken AC, Hocke AC, Walter C, Schmeck B, et al. Differences in cell activation by Chlamydia pneumoniae and Chlamydia trachomatis infection in human endothelial cells. *Infect Immun.* 2004;72:6615-21.
24. Kilic T, Jneid H, Ural E, Oner G, Sahin T, Kozdag G, et al. Impact of the metabolic syndrome on high-sensitivity C reactive protein levels in patients with acute coronary syndrome. *Atherosclerosis.* 2009;207:591-6.
25. Executive summary of the third report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (adult treatment panel III). *JAMA.* 2001;285:2486-97.
26. Bas S, Muzzin P, Vischer TL. Chlamydia trachomatis serology: diagnostic value of outer membrane protein 2 compared with that of other antigens. *J Clin Microbiol.* 2001;39:4082-5.

27. Mahony JB, Schachter J, Chernesky MA. Detection of antichlamydial immunoglobulin G and M antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol.* 1983;18:270-5.
28. Ellis R. Infection and coronary heart disease. *J Med Microbiol.* 1997;46:535-9.
29. Siscovick D, Schwartz S, Corcy L, Grayston T, Ashley R, Wang S, et al. Chlamydia pneumoniae, herpes simplex virus type 1, and cytomegalovirus and incident myocardial infarction and coronary heart disease death in older adults: The Cardiovascular Health Study. *Circulation.* 2000;102:2335-40.
30. Ervin RB. Prevalence of metabolic syndrome among adults 20 years of age and over, by sex, age, race and ethnicity, and body mass index: United States, 2003-2006. *Natl Health Stat Report.* 2009;5:1-7.
31. Adegoke O, Adedoyin R, Adebayo R, Bisiriyu L, Salawu A. Prevalence metabolic syndrome in a rural community in Nigeria. *Metab Syndr Relat Disord.* Epub 2009 Nov 24.
32. Gupta R, Deedwania P, Gupta A, Rastogi S, Panwar R, Kothari K. Prevalence of metabolic syndrome in an Indian urban population. *Int J Cardiol.* 2004;97:257-61.
33. Franco G, Scala L, Alves C, França G, Cassaneili T, Jardim P. Metabolic syndrome in patients with high blood pressure in Cuiabá - Mato Grosso State: prevalence and associated factors. *Arq Bras Cardiol.* 2009;92:437-42.
34. den Hartog J, Land J, Stassen F, Kessels A, Bruggeman C. Serological markers of persistent *C. trachomatis* infections in women with tubal factor subfertility. *Hum Reprod.* 2005;20:986-90.
35. Wilkowska-Trojnieł M, Zdrodowska-Stefanow B, Ostaszewska-Puchalska I, Zbucka M, Wołczyński S, Grygoruk C, et al. Chlamydia trachomatis urogenital infection in women with infertility. *Adv Med Sci.* 2009;54:82-5.
36. Tuuminen T, Palomäki P, Paavonen J. The use of serologic tests for the diagnosis of chlamydial infections. *J Microbiol Methods.* 2000;42:265-79.
37. Danesh J, Whincup P, Walke M, Lennon L, Thomson A, Appleby P, et al. Chlamydia pneumoniae IgG titres and coronary heart disease: prospective study and meta-analysis. *BMJ.* 2000;321:208-13.

38. Kiechl S, Lgger G, Mayr M, Wiedermann C, Bonora E, Oberhollenzer F, et al. Chronic infection and the risk of carotid atherosclerosis: prospective results from a large population study. *Circulation*. 2001;103:1064-70.
39. LaBiche R, Koziol D, Quinn T, Gaydos C, Azhar S, Ketron G, et al. Presence of Chlamydia pneumoniae in human symptomatic and asymptomatic carotid atherosclerotic plaque. *Stroke*. 2001;32:855-60.
40. García-Elorriaga G, Calderón-Abbo M, González-Bonilla C. Association between cardiovascular disease and anti-Chlamydia pneumoniae antibodies. *Salud Publica Mex*. 2002;44:243-6.
41. Pinar A, Oç M, Akyön Y, Farsak B, Koçyıldırım E, Us D, et al. The presence of Chlamydia pneumoniae, Helicobacter pylori and cytomegalovirus in human atherosclerosis detected by molecular and serological methods. *Mikrobiyol Bul*. 2004;38:213-22.
42. Kilic A, Onguru O, Tugcu H, Kilic S, Guney C, Bilge Y. Detection of cytomegalovirus and Helicobacter pylori DNA in arterial walls with grade III atherosclerosis by PCR. *Pol J Microbiol*. 2006;55:333-7.
43. Lunardi C, Dolcino M, Peterlana D, Bason C, Navone R, Tamassia N, et al. Endothelial cells activation and apoptosis induced by a subset of antibodies against human cytomegalovirus: relevance to the pathogenesis of atherosclerosis. *PLoS One*. 2007;2:e473.
44. Shi Y, Tokunaga O. Herpesvirus (HSV-1, EBV and CMV) infections in atherosclerotic compared with non-atherosclerotic aortic tissue. *Pathol Int*. 2002;52:31-9.
45. Alber D, Powell K, Vallance P, Goodwin D, Grahame-Clarke C. Herpesvirus infection accelerates atherosclerosis in the apolipoprotein E-deficient mouse. *Circulation*. 2000;102:779-85.
46. Kotronias D, Kapranos N. Herpes simplex virus as a determinant risk factor for coronary artery atherosclerosis and myocardial infarction. *In Vivo*. 2005;19:351-7.
47. Alyan O, Kacmaz F, Ozdemir O, Deveci B, Astan R, Celebi A, et al. Hepatitis C infection is associated with increased coronary artery atherosclerosis defined by modified Reardon severity score system. *Circ J*. 2008;72:1960-5.

48. Ishizaka N, Ishizaka Y, Takahashi E, Toda E, Hashimoto H, Ohuo M, et al. Increased prevalence of carotid atherosclerosis in hepatitis B virus carriers. *Circulation*. 2002;105:1028-30.
49. Zhu J, Quyyumi AA, Norman J, Costello R, Csako G, Epstein S. The possible, role of hepatitis A virus in the pathogenesis of atherosclerosis. *J Infect Dis*. 2000;182:1583-7.
50. Haider A, Wilson P, Larson M, Evans J, Michelson E, Wolf P, et al. The association of seropositivity to Helicobacter pylori, Chlamydia pneumoniae, and cytomegalovirus with risk of cardiovascular disease: a prospective study. *J Am Coll Cardiol*. 2002;40:1408-13.
51. Tsai C, Kao J, Hus K, Chiang F, Tseng C, Liao C, et al. Relation of Chlamydia pneumoniae infection in Taiwan to angiographically demonstrated coronary artery disease and to the presence of acute myocardial infarction or unstable angina pectoris. *Am J Cardiol*. 2001;88:960-3.
52. Köksal A, Ekmekçi Y, Karadeniz Y, Köklu S, Apan T, Yilmaz M, et al. Helicobacter pylori seropositivity and atherosclerosis risk factors. *Dig Dis*. 2004;22:386-9.
53. Auer J, Leitinger M, Berent R, Prammer W, Weber T, Lassnig E, et al. Hepatitis A IgG seropositivity and coronary atherosclerosis assessed by angiography. *Int J Cardiol*. 2003;90:175-9.
54. Caliskan Y, Oflaz H, Pusuroglu H, Boz H, Yazici H, Tamer S, et al. Hepatitis C virus infection in hemodialysis patients is not associated with insulin resistance, inflammation and atherosclerosis. *Clin Nephrol*. 2009;71:147-57.
55. Yang K, Chen M, Su T, Jeng J, Hwang B, Lin L, et al. Hepatitis B virus seropositivity is not associated with increased risk of carotid atherosclerosis in Taiwanese. *Atherosclerosis*. 2007;195:392-7.
56. Haberbosch W, Jantos C. Chlamydia pneumoniae infection is not an independent risk factor for arterial disease. *Herz*. 2000;25:79-83.
57. Fan Y, Wang S, Yang X. Chlamydia trachomatis (mouse pneumonitis strain) induces cardiovascular pathology following respiratory tract infection. *Infect Immun*. 1999;67:6145-51.

58. Hatch G, McClarty G. C. trachomatis-infection accelerates metabolism of phosphatidylcholine derived from low density lipoprotein but does not affect phosphatidylcholine secretion from hepatocytes. *BMC Microbiol.* 2004;4:8.
59. Blessing E, Nagano S, Campbell L, Rosenfeld M, Kuo C. Effect of Chlamydia trachomatis infection on atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Infect Immun.* 2000;68:7195-7.
60. Mavrogeni SM, Spargias K, Kolovou G, Saroglu G, Cokkinos DV. Myocardial involvement in a patient with Chlamydia trachomatis infection. *J Card Fail.* 2008;14:351-3.
61. Bachmaier K, Neu N, de la Maza L, Pal S, Hessel A, Penninger J. Chlamydia infections and heart disease linked through antigenic mimicry. *Science.* 1999;283:1335-9.
62. Pfister G, Stroh CM, Perschinka H, Kind M, Knoflach M, Hinterdorfer P, et al. Detection of HSP60 on the membrane surface of stressed human endothelial cells by atomic force and confocal microscopy. *J Cell Sci.* 2005;118:1587-94.
63. Kol A, Bourcier T, Lichtman A, Libby P. Chlamydial and human heat shock protein 60s activate human vascular endothelium, smooth muscle cells, and macrophages. *J Clin Invest.* 1999;103:571-7.
64. Xu Q, Amberger A, Van der Zee R, Recheis H, Willeit J, Wick G, et al. Autoantibodies against heat shock protein 60 mediate endothelial cytotoxicity. *J Clin Invest.* 1995;96:2569-77.
65. Mandal K, Foteinos G, Jahangiri M, Xu Q. Role of anti heat shock protein 60 autoantibodies in atherosclerosis. *Lupus.* 2005;14:742-6.
66. Halme S, Syrjälä H, Bloigu A, Saikku P, Leinonen M, Airaksinen J, et al. Lymphocyte responses to Chlamydia antigens in patients with coronary heart disease. *Eur Heart J.* 1997;18:1095-101.
67. Cappello F, Conway de Macario E, Di Felice V, Zummo G, Macario A. Chlamydia trachomatis infection and anti-Hsp60 immunity: the two sides of the coin. *PLoS Pathog.* Epub 2009 Aug 28.

68. Franck M, Staub H, Petracco J, Norman G, Lassen A, Schiavo N, et al. Autoantibodies to the atheroma component beta2-glycoprotein I and risk of symptomatic peripheral artery disease. *Angiology*. 2007;58:295-302.
69. Staub H, Norman G, Crowther T, Cunha V, Polanczyk A, Bohn J, et al. Antibodies to the atherosclerotic plaque components beta2-glycoprotein and heat shock proteins as risk factors for acute cerebral ischemia. *Arq Neuropsiquiatr*. 2003;61:757-63.
70. Lottermann A, Ranzolin A, von Muhlen C, Staub H. Anticorpos contra proteína de choque térmico, autoimunidade e aterosclerose. *Rev Bras Reumatol*. 2003;43:302-8.
71. Gromadzka G, Zielinska J, Ryglewicz D, Fiszer A, Członkowska A. Elevated levels of anti-heat shock protein antibodies in patients with cerebral ischemia. *Cerebrovasc Dis*. 2001;12:295-9.
72. Xu Q, Kiechl S, Mayr M, Metzler B, Egger G, Oberhollenzer F, et al. Association of serum antibodies to heat-shock protein 65 with carotid atherosclerosis: clinical significance determined in a follow-up study. *Circulation*. 1999;100:1169-74.
73. Xu Q, Willeit J, Maroé M, Kleindienst R, Oberhollenzer F, Kiechl S, et al. Association of serum antibodies to heat-shock protein 65 with carotid atherosclerosis. *Lancet*. 1993;341:255-9.
74. Bachmaier K, Penninger J. Chlamydia and antigenic mimicry. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2005;296:153-63.
75. Jha H, Prasad J, Mittal A. High immunoglobulin A seropositivity for combined Chlamydia pneumoniae, Helicobacter pylori infection, and high-sensitivity C-reactive protein in coronary artery disease patients in India can serve as atherosclerotic marker. *Heart Vessels*. 2008;23:390-6.
76. Nishimura M, Hashimoto T, Kobayashi H, Fukuda T, Okino K, Yamamoto N, et al. Close association of Chlamydia pneumoniae IgA seropositivity by ELISA with the presence of coronary artery stenosis in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2005;20:1944-50.
77. Stone A, Mendall M, Kaski JC, Edger TM, Risley P, Poloniecki J, et al. Effect of treatment for Chlamydia pneumoniae and Helicobacter pylori on markers of inflammation and cardiac events in patients with acute coronary syndromes: South Thames Trial of Antibiotics in Myocardial Infarction and Unstable Angina (STAMINA). *Circulation*. 2002;106:1219-23.

78. Gurfinkel E, Bozovich G, Daroca A, Beck E, Mautner B. Randomised trial of roxithromycin in non-Q-wave coronary syndromes: ROXIS Pilot Study. ROXIS Study Group. *Lancet*. 1997;350:404-7.

79. Jaff M, Dale R, Creager MA, Lipicky RJ, Constant J, Campbell LA, et al. Anti-chlamydial antibiotic therapy for symptom improvement in peripheral artery disease: prospective evaluation of rifalazil effect on vascular symptoms of intermittent claudication and other endpoints in Chlamydia pneumoniae seropositive patients (PROVIDENCE-1). *Circulation*. 2009;119:452-8.

6 ARTIGO EM INGLÊS

Anticorpos contra *Chlamydia trachomatis* e síndrome metabólica

Antibodies to *Chlamydia trachomatis* and metabolic syndrome

Luciele Sehnem¹, Luiz Carlos Bodanese², Giuseppe Repetto³, Henrique L. Staub⁴

¹ *Biomedic. Undertaking Master's in Medicine and Health Science with emphasis in Medical Clinic at Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). Professor of Department Nursing and Dentistry, University of Santa Cruz do Sul (UNISC).*

² *PhD in Cardiology. Chief of Cardiology, Hospital São Lucas da PUCRS. Professor, Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine of PUCRS. Professor of Postgraduate Medicine and Health Sciences, Faculty of Medicine of PUCRS.*

³ *Doctor with emphasis in Endocrinology, focusing mainly on the following topics: Obesity, Diabetes, Thyroid and Metabolic Syndrome. Professor of PUCRS.*

⁴ *Doctor in Rheumatology and Master in Immunologic Clinic. Assistant Professor in Rheumatology at the Faculty of Medicine of PUCRS. Professor of the Post Graduation Program of the Medicine Faculty at PUCRS.*

Mail Address:
Luciele Sehnem
480 Osvaldo Aranha street, Apto 201
Santa Cruz do Sul/RS – Brasil 96820-150
E-mail: lucielesehnem@unisc.br

ABSTRACT

The metabolic syndrome (MS) comprises a cluster of risk factors for atherosclerotic disease. Pathogens such as *Chlamydia pneumoniae* and *Helicobacter pylori* may be involved on triggering and perpetuation of atherogenesis, but their relationship with MS is rather unknown. Exposition to *Chlamydia trachomatis* (CT) in patients with MS has been unexplored in the literature up to date.

Objective: to evaluate the association, if any, of IgA and IgG anti-CT antibodies and occurrence of MS.

Methods: in this cross-sectional study, patients with MS with and without previous cardiovascular disease and age and age and sex-matched controls were evaluated. MS diagnosis was based on NCEP criteria. IgA and IgG anti-CT antibodies were detected by immunoenzymatic assay; titers above 1.1 units were considered as positive. The chi-squared test was utilized for comparison of categoric variables, and the t test for continuous variables. To estimate the association of anti-CT antibodies and MS, odds ratios were calculated. Logistic regression was utilized for adjustment of age and sex.

Results. The total survey included 238 individuals: 101 patients (42.5%) with MS without cardiac events; 47 (19.7%) with MS and previous cardiac events; and 90 (37.8%) healthy controls. Females predominated in the 3 groups of patients. The global mean age was 59.7 years. The prevalence of a positive test for IgA anti-CT was higher in patients with MS (17%) than in controls (6%) ($P=0.015$). Elevated levels of IgA anti-CT associated significantly with occurrence of MS in comparison to healthy controls after adjustment for sex and age ($OR=3.4$; $CI_{95\%} 1.2-9.4$; $P=0.015$). In the subgroup analysis, elevated levels of IgA anti-CT were more prevalent in non-complicated MS than in controls ($P=0.013$). After adjustment for age and sex, the association of IgA anti-CT with non-complicated MS remained defined ($OR=3.6$; $CI_{95\%} 1.32-10.2$; $P=0.015$).

Conclusions: IgA anti-CT antibodies, possibly of acute phase, were more prevalent in MS than in healthy controls. A positive test for IgA anti-CT associated particularly to non-complicated MS. The role of such IgA response in patients with MS should be detailed in forthcoming studies.

Key words: metabolic syndrome, *Chlamydia trachomatis*, cardiovascular disease.

Introduction

Metabolic Syndrome (METS) is a combination of abdominal obesity, arterial hypertension and glycolipid metabolism abnormalities. The *National Cholesterol Education Programme Adult Treatment Panel III* (NCEP ATP III) considers METS a proinflammatory and prothrombotic state culminating in cardiovascular diseases. Thus, METS is considered a proatherogenic entity. The prevalence of METS in the United States is estimated as 24% of the adult population¹⁻³. The association between METS and cardiovascular disease (particularly in males) was confirmed by Lakka *et al* (2002)⁴.

METS is notable for generating a chronic inflammatory response⁵. Adipocytes of patients with METS are known to synthesize proinflammatory cytokines as tumor necrosis factor (TNF) and interleukin 6 (IL-6); these in turn stimulate the production of C-reactive protein (CRP) by the hepatocytes⁶⁻⁹.

Intravascular inflammation plays a relevant role in triggering atherogenesis. There are signs that infectious agents can predispose to the development of atherosclerosis and cardiovascular events. Exposure to pathogens such as herpes virus type 1, hepatitis A, B and C virus, cytomegalovirus, *Helicobacter pylori* and *Chlamydia pneumoniae* could be involved in triggering atherosclerotic disease¹⁰⁻¹³. Murine infection by *Chlamydia pneumoniae* of the AR39 subtype significantly exacerbated the aortic atheromatosis in the presence of hypercholesterolemia¹⁴.

Thermal shock proteins (Hsp) from pathogens such as *Chlamydia pneumoniae* are highly homologous with 60 kilodalton (kDa) endothelial Hsp. Endothelial Hsp in turn participate directly in atherogenesis when they stimulate the migration of smooth muscle cells to the intima layer and activate monocytes. Cross-reactive anti-Hsp antibodies could speed up autoimmune endothelial damage¹⁵.

A possible proatherogenic effect which can be attributed to exposure to gram-negative genus *Chlamydia* bacteria is far from being clearly understood^{16,17}. *Chlamydia* are obligatory intracellular pathogens, with a biphasic life cycle. In the extracellular medium their elementary bodies can activate the macrophagic and lymphocytary system, with the consequent release of proinflammatory cytokines such as TNF and gamma-interferon¹⁸.

Chlamydia trachomatis (CT), with predominantly sexual transmission, may cause eye infections such as trachoma and urogenital infections¹⁹. In turn, exposure to *Chlamydia pneumoniae* causes respiratory tropism infections. The comparative analysis of genomes of

the two species shows that 214 pre-protein sequences of *Chlamydia pneumoniae* are not found in the genome of CT, which might explain the different biological behavior of the two species²⁰.

There are signs that *Chlamydia pneumoniae* may infect endothelial cells, smooth muscle cells, macrophages and lymphocytes, all of them involved in atherogenesis²¹. Importantly, CT subtypes H and L also infect human endothelial cells in a culture; the endothelial exposure to these species of *Chlamydia* induces a procoagulant state manifested by the hyperexpression of tissue factor²². Although other authors confirmed infection of endothelial cells by CT, they did not observe the synthesis of IL-8 and adenes by the endothelium under these circumstances, differently from what occurred when there was exposure to *Chlamydia pneumoniae*²³.

The possible participation of genus *Chlamydia* bacteria in the atherogenic process is quite polemical. It is possible if these bacteria are associated with intravascular autoimmune phenomena via the expression of Hsp homologous to the endothelial ones. A direct effect of these pathogens on the endothelial wall can also not be ruled out.

Most of the studies directed at the CT-vascular damage binomial are based on animal models, or series of case. There are few observational studies which evaluated exposure to CT in patients with atherosclerotic disease. In METS, the main focus of this study, the role of infection by CT has not yet been analyzed. METS, as a proinflammatory and prothrombotic entity²⁴, seems appropriate to us for the study of the CT-vasculopathy relationship.

In this context, we aim to evaluate the prevalence of acute phase antibodies (IgA) and memory antibodies (IgG) against CT in metabolic patients, with and without prior cardiovascular events. This dichotomization of patients with METS may allow us to reach more detailed conclusions about the role of CT in this context. At the same time we will evaluate whether a positive test for anti-CT IgA or IgG is associated with the occurrence of METS.

Materials and Methods

Population

The controlled cross-sectional study included individuals with METS who are being followed at the Outpatient Clinic for Cardiometabolic Risk at Hospital São Lucas of the Pontifical Catholic University-PUCRS (HSL-PUCRS). The sample was selected independently of sex or race. It was divided into three groups: patient with METS without cardiac events, patients with METS with a prior cardiac event (acute myocardial infarction, acute coronary syndrome, history of myocardial revascularization surgery) and controls. The confirmation of cardiac events was obtained by looking at the medical files.

In order to diagnose METS, the classical criteria of NCEP²⁵ were followed, where at least three of the characteristics below were present: abdominal circumference ≥ 102 cm if male or ≥ 88 cm if female; triglyceride serum levels ≥ 150 mg/dl; high density lipoprotein (HDL) serum levels of cholesterol < 40 mg/dl if male or < 50 mg/dl if female; blood pressure $\geq 130/85$ mmHg; fasting glycemia ≥ 100 mg/dl.

The group of controls, paired by sex and age, was selected at the Hospital São Lucas (HSL) blood bank at PUCRS. The controls were tested in the Pathology Laboratory of HSL/PUCRS for HDL, glucose and triglycerides, besides the routine immunological tests (anti-HIV 1/2, anti-HCV, anti-HTLV, Chagas, VDRL, HbsAg and anti-Hbc). Individuals who presented three or more diagnostic criteria for METS according to NCEP²⁵ were excluded from this group. The clinical and demographic data were obtained by filling out a form during an interview with donors or family members, and the following characteristics were considered: age, sex and history of coronary artery disease. All individuals in the study agreed to participate in the research on presenting the Letter of Free and Informed Consent.

Serology

The blood samples (5 ml) were collected from a peripheral vein, centrifuged to obtain the serum and frozen up to 2 hours after collection. They were then stored at -70°C for later immunoenzymatic testing.

The serology was performed in the Immunology Laboratory at HSL-PUCRS. Antibodies of IGA and IgG isotopes against *Chlamydia trachomatis* were evaluated using an immunoenzymatic assay (ELISA) with the *Chlamydia trachomatis* IgA and IgG - SYM commercial kit of ALKA[®] – Tecnologia em Diagnóstico, São Paulo, Brazil. The CT antigen linked to the solid phase of the plate was the external protein of the membrane. The

liposaccharid responsible for most of the cross-reactions with other species of *Chlamydia* was not included in the microplate. In brief, 5 µl of the patient's serum and of the positive and negative controls (in duplicate) were placed in the microplate wells and diluted in 100 µl of dilutant of the samples containing a phosphate buffer with protein stabilizer. Then the plate was incubated in an oven at 37°C for 45 minutes. The microplate was then submitted to 5 washings, in which unspecific antibodies were eliminated. Next, 100 µl of the enzymatic conjugate (human anti-IgA or anti-IgG solution conjugated with peroxidase) were added to all the microplate wells; the plate was then incubated again at 37°C for 30 minutes. After five washings, 100 µl of colorless substrate were placed in all the wells. The microplate was then incubated in the dark at ambient temperature for 20 minutes. Fifty µl of the stop solution were added. The results were obtained after test validation, depending on sample absorbance, evaluated by spectrophotometry with a 450/620nm wavelength. The color intensity obtained with samples from patients with METS was compared to that of the controls. Titers were considered positive when above 1.1 units for the two isotypes and negative when below 0.9 units for both isotypes^{26,27}.

Statistical methods

The confidence interval (CI) based on binomial distribution was used in the analysis of proportion. The Chi-squared test was used to compare the categorical variables, and the Student t test to compare the continuous variables. In order to estimate the degree of association between anti-CT antibodies and METS outcome, odds ratios (OR) with a confidence interval of 95% (CI95%) were calculated. Logistic regression was used to adjust the confounding factors (sex and age). The data were analyzed with the help of the *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) for Windows program, version 11.5, Chicago, IL.

Ethical Considerations

The research project in this study was submitted to the Ethics in Research Committee of the Medical School at PUCRS, and approved on August 7, 2009, registered under number OF.CEP-1008/09.

Results

The overall sample of the study was 238 individuals (72.3% women, $P < 0.0001$). One hundred and one patients comprised the METS group without prior cardiac events (METSwoE); 47 patients presented METS and prior cardiac events (METSwe), and 90 individuals comprised the group of healthy controls. Females predominated in the 2 groups with METS, and this information was not significant in the comparison with healthy controls. The overall mean age was 59.7 (± 9.9 SD); in patients with METS as a whole, the mean age was 60.2 years. There was no significant difference in the mean age between the groups of patients with METS and controls. These data are summarized in [table 1](#).

Table 1. Demographic data of the sample.

	Total (n=238)	Women (n=172)	Mean Age			
	N	N	P*	Years	\pm SD	P**
METSwoE	101 (42.5%)	78 (78.2%)	0.34	58.9	9.9	0.64
METSwe	47 (19.7%)	28 (59.6%)	0.13	61.6	8.5	0.36
Controls	90 (37.8%)	65 (72.2%)		59.6	10.6	

n/N: sample number; SD: standard deviation; METSwoE: METS without cardiac events; METSwe: METS with cardiac event; *Chi-square test, compared to controls; **Student t test, compared to controls.

The prevalence of anti-CT IgA and IgG, as well as the association between these antibodies and METS after adjustment for sex and age by logistic regression, is shown in [table 2](#). High levels of anti-CT IgA were detected considerably more in patients with METS than in healthy controls. The occurrence of a positive test for anti-CT IgA was significantly associated with METS.

Table 2. Association between anti-CT IgA and IgG and METS.

	With METS (n=148)	Controls (n=90)	OR *	CI95%	P **
Anti-CT IgA	17.0%	6.0%	3.4	1.2-9.4	0.015
Anti-CT IgG	4.1%	2.2%	1.8	0.4-9.5	0.45

CT: *Chlamydia trachomatis*; METS: metabolic syndrome, n: absolute number; OR*: odds ratio adjusted for sex and age; CI95%: 95% confidence interval; ** Chi-square test.

The frequency of positivity for anti-CT antibodies was compared in the 3 groups of individuals (table 3). The positive test frequency for anti-CT IgA was significant in patients with METSwoE compared to the healthy controls; there was no significant difference in the other comparisons between the three groups.

Table 3. Prevalence of anti-CT IGA and IgG antibodies in individuals with METS (with and without cardiac events) and controls.

	METS woE (n=101)	Controls (n=90)	P*	METS wE (n=47)	Controls (n=90)	P*	METS woE (n=101)	METS wE (n=47)	P*
Anti-CT IgA	18%	6%	0.013	15%	6%	0.11	18%	15%	0.81
Anti-CT IgG	3%	2.2%	0.99	6.4%	2.2%	0.34	3%	6.4%	0.39

CT: *Chlamydia trachomatis*; METS: metabolic syndrome; METSwoE: METS without cardiac events, METSwE: METS with cardiovascular events; * Chi-square test.

After adjusting for sex and age in a logistic regression model, OR were obtained for anti-CT IgG and IgA antibodies in the different comparisons between the three groups of individuals. The effect of these adjustments using logistic regression in OR can be seen in table 4. A positive test for anti-CT IgA was associated significantly with the occurrence of METSwoE when these were compared to healthy controls. The association involving anti-CT IgA was not confirmed when individuals with METSwE were compared to healthy controls, or when the 2 groups of patients with METS were compared to each other. The occurrence of a positive test for anti-CT IgG was not associated with METS in any of the combinations tested.

Table 4. Odds ratios adjusted for anti-CT IgA and IgG in the different groups.

	OR*	CI95%	P
Anti-CT IgA: METSwoE x controls	3.6	1.32-10.2	0.015
Anti-CT IgG : METSwoE x controls	1.2	0.2-7.5	0.82
Anti-CT IgA : METSwe x controls	3.1	0.9-10.9	0.06
Anti-CT IgG: METSwe x controls	3.6	0.5-22.0	0.17
Anti-CT IgA : METSwe x METSwoE	1.2	0.05-1.7	0.19
Anti-CT IgG : METSwe x METSwoE	0.32	0.45-3.2	0.69

CT: *Chlamydia trachomatis*; OR adjusted for sex and age in a logistic regression model. CI95% 95% confidence interval; METSwoE: METS without cardiovascular events; METSwe: METS with cardiovascular events.

Discussion

The role of pathogens on the atherogenesis process has caused great controversy in the scientific community in recent years²⁸. The relationship of METS, a proatherogenic entity, with infectious agents has not been much studied so far; possibly pathogens contribute directly or indirectly to atheroma formation²⁹. It is known that *Chlamydia* microorganisms, including CT, can infect endothelial cells^{22,23}.

Our study evaluated the frequency of anti-CT IgA and IgG antibodies in patients with METS. A subgroup of our patients was in a preatherosclerotic situation (non-complicated METS), while the other subgroup presented a history of cardiovascular problems. This stratification of patients with METS enabled us to present a few hypotheses that are of interest. At the same time, we looked at the association between a positive test for anti-CT antibodies and the occurrence of METS.

The overall cases of the study included 238 individuals (two thirds female). Women predominated in both groups of patients with METS (non-complicated and with a cardiovascular history). The controls were paired by sex. Predominance by sex in patients with METS has not been defined in the literature; METS can prevail among males³⁰, occur without differences in both sexes³¹ or, as in our study, predominate in females³². This discrepancy of findings can be explained by the selection of the samples and design of the studies³⁰⁻³².

The mean age of our global sample was around 59 years (around 60 years in the METS group). The controls group was paired by age, which implied equity in the distribution of the mean ages in individuals with METS and controls. The mean age group of our patients with METS agrees with the data of other studies^{32,33}. METS occurred more between the age of 55 and 64 years and increased with age, according to a Latin-American study¹.

Considering the total population of patients with METS compared to healthy controls, high levels of anti-CT IgA (but not of IgG) were considerably more frequent in the target population. The OR obtained after adjusting for sex and age (3.4; CI95% 1.2-9.4; P=0.015) indicated an association of a positive test for anti-CT IgA with METS. In another rare study involving infectious agents and METS, IgG anti-*Chlamydia pneumoniae* was significantly associated with METS in an Iranian population; anti-CT antibodies were not evaluated¹².

Our data indicated that a positive test for anti-CT IgA was more prevalent in the population of patients with non-complicated METS than in healthy controls (P=0.013). When we compared patients with complicated METS and controls, there was no significant difference in positivity for CT IgA; it is thus inferred that the overall association between anti-CT IgA and METS was based on the greater positivity of the subgroup of non-complicated patients.

After adjustments for sex and age, we found that a positive test for anti-CT IgA was significantly associated with non-complicated METS when compared to healthy controls (OR=3.6; CI95% 1.32-10.2; P=0.015). This did not occur when patients with METS associated with prior events were compared to controls, or when the two metabolic populations were mutually compared. Interestingly, a positive test for anti-CT IgG was not associated with the occurrence of any of the two METS sub-groups.

Our option of testing isotype IgA as a presumably acute phase antibody is based on the tropism of CT by mucous membranes. Recent data corroborate the testing of anti-CT IgA in urogenital infections^{34,35}. Although the accuracy of the serological methods (indirect immunofluorescence, immunoenzymatic assay) to detect anti-CT antibodies is a matter of debate, serology is still preferable to other methods under these circumstances³⁶. We chose the immunoenzymatic method due to the availability of this assay at our Hospital.

The exacerbated anti-CT IgA response seen in our patients with METS was not previously described in the literature. This antibody response may reflect an exposure to the pathogen during the acute phase. Memory isotypes (IgG) were not significantly detected in

our METS patients, which would theoretically increase the possibility of a recent IgA response in these individuals.

The reasons why the anti-CT IgA response predominated in our patients with non-complicated METS are unknown. An hypothesis we could postulate is that the infectious “trigger” that generates the IgA response could be selectively present before the event, tending to disappear after the ischemic episode. The reasons why the IgA response becomes undetectable in patients with cardiac events are also unknown, but could include the clearance of the IgA-CT complex by macrophages, during or right after the ischemic event, or else the incapacity to generate humoral response post ischemic event.

An ethiopathogenic role has been postulated for infectious agents in established atherosclerotic disease, but the intrinsic mechanisms of this relationship are unknown^{35,37-39}. The agents commonly associated with atherosclerosis include *Chlamydia pneumoniae*^{40,41}, *Helicobacter pylori*^{41,42}, cytomegalovirus^{43,44}, herpes virus^{45,46} and hepatitis A, B and C virus⁴⁷⁻⁴⁹. In contrast, other authors reported the absence of association between atherosclerotic disease and exposure to *Chlamydia pneumoniae*^{50,51}, *Helicobacter pylori*^{50,52}, cytomegalovirus^{42,50}, herpes virus⁵¹ or hepatitis virus⁵³⁻⁵⁵. *Chlamydia pneumoniae* infection can be considered a contributing factor to atherogenesis, but not an independent risk factor for atherosclerotic disease⁵⁶.

Our subgroup of patients with METS and prior cardiac events conceptually comprises individuals with established atherosclerosis. In this specific subpopulation, the prevalence of anti-CT IgA and IgG was not increased in comparison to controls, and a positive test for the two isotypes was not associated with the outcome. There is a notable scarcity of literature on the association of anti-CT antibodies and established atherosclerotic disease.

Murine exposure to CT was able to trigger respiratory infection and later cardiovascular disease⁵⁷. The phosphatidylcholine metabolism derived from LDL is accelerated in the presence of CT infection⁵⁸. It is noteworthy that nasal exposure of apolipoprotein E-deficient murines to *Chlamydia pneumoniae* accelerated aortic atheromatosis; when the animals were inoculated with CT, the inflammatory changes in the aorta were mild and transient⁵⁹. Mavrogeni *et al* (2008) documented the presence of myocardioathy in a patient infected by CT and with a history of recurrent prostatitis⁶⁰.

A molecular mimicry mechanism is a plausible explanation for the possible pathogenicity of anti-CT antibodies in patients with METS and atheromatosis. In this context, 60 kDa proteins of the external membrane (probably Hsp) of several species of *Chlamydia*

mimic peptidic sequences of cardiac myosin; immunization of murines with this peptide induced myocardial pathology, probably due to a cross-reactive humoral response⁶¹.

The detection of Hsp60 on the surface of activated endothelial cells was recently confirmed by focal microscopy⁶². Hsp60 derived from *Chlamydia*, as well as human Hsp60, can activate endothelial cells, smooth muscle cells and macrophages⁶³. An anti-Hsp60 humoral response may be cytotoxic to the endothelium according to data from 1995⁶⁴. Anti-Hsp50 antibodies can stimulate the synthesis of proinflammatory cytokines by the endothelium, and high levels of this antibody were associated with the severity of the atherosclerotic process⁶⁵. In men with coronary disease, apart from exacerbated anti-*Chlamydia pneumoniae* IgA and IgG responses, a marked cell response to CT antigens was documented⁶⁶.

It could be accepted that the IgA antibody response observed in our METS patients reflects humoral activity against Hsp from CT, and by molecular homology also against endothelial Hsp60. Indeed, recent data indicate that in patients with persistent infection by CT, autoimmunity and atherogenesis may result from an antibody response directed to endothelial Hsp60. On the other hand, tumor cells expressing surface Hsp60 can be lysed by cross-reactive antibodies; in the latter circumstance, in patients exposed to CT, a cross-reactive anti-Hsp response could be protective for neoplasms⁶⁷.

In recent years, our research group evaluated a possible association of IgG antibodies against human Hsp60 and mycobacterial Hsp65 with atherosclerotic disease. Elevated levels of anti-Hsp60 showed a defined and independent association with peripheral arterial disease⁶⁸. Anti-Hsp60 and anti-Hsp65 also independently associated with acute cerebral ischemic disease⁶⁹, but not with acute myocardial infarction⁷⁰. Other authors confirmed an independent association of anti-Hsp65 antibodies with ischemic cerebral vascular disease⁷¹ and obstructive carotid disease^{72,73}.

Also of interest, other CT components, that are not Hsp, can mimic human proteins and be the target of cross-reactive antibodies. This is the case of DNA primase of CT⁷⁴.

The relationship of anti-CT antibodies, METS and atherosclerosis warrants further studies. Currently the data are insufficient to define diagnostic and therapeutic implications. As to the *Chlamydia pneumoniae*- atherosclerotic disease binomial, not discussed in this study, IgA antibodies to this pathogen were associated with the occurrence of coronary stenosis according to two studies^{75,76}.

The data concerning antibiotic therapy for *Chlamydia pneumoniae* in patients with established atherosclerotic disease are in conflict. Twelve weeks of treatment with antibiotics

reduced cardiac events in patients with acute coronary syndromes by 36%, after 1 year of observation⁷⁷.

In another study, the effect of treatment with macrolide antibiotics was short-lived in patients with angina pectoris⁷⁸. In peripheral arterial disease, the use of rifalazil, a powerful anti-*Chlamydia pneumoniae* drug, did not modify the quality of life of patients compared to controls⁷⁹. Data on a possible treatment for CT infection in patients with METS or atherosclerotic disease, not available at this point, are expected for the future.

Study limitations

Although the comparative results indicate that the elevated levels of anti-CT IgA are more frequent in METS than in healthy controls, we should emphasize that the overall prevalence of a positive antibody test was relatively small (17%). Moreover, test positivity in healthy controls was not negligible (6%). Although the total number of controls was not exactly small, it was smaller than the overall number of patients with METS, and this is certainly one of the limitations of our study. However, the numerical difference in relation to the controls practically disappears when analyzing subgroups of patients with METS.

Even though the individuals in our control group did not fulfill the classical criteria for METS, the possible occurrence of isolated stigmata of METS in these individuals is another limitation of our study. Not obtaining data referring to race in the controls made it impossible to adjust for this variable in the statistical analysis.

Finally, we admit that if we had tested for both anti-CT antibodies and antibodies against Hsp60 (human and /or of *Chlamydia*), we could have obtained data of interest in the interpretation of this intriguing anti-CT IgA response seen in METS. Further studies are needed to explain the ethiopathogenic role of anti-CT IgA response in these individuals.

Conclusions

I) The prevalence of IgA anti-CT, but not of anti-CT IgG antibodies, was significantly higher in patients with METS than in healthy controls matched by sex and age;

II) The occurrence of anti-CT antibodies was associated with the presence of METS as a whole;

III) The IgA anti-CT response, presumably of the acute phase, predominated in patients with non-complicated metabolic syndrome as compared to healthy controls;

IV) A positive test for IgA anti-CT was associated with the presence of non-complicated METS, independent of sex and age.

References

1. Escobedo J, Schargrotsky H, Champagne B, Silva H, Boissonnet CP, Vinueza R, et al. Prevalence of the Metabolic syndrome in Latin America and its association with sub-clinical carotid atherosclerosis: the CARMELA cross sectional study. *Cardiovas Diabetol.* 2009;8:1-9.
2. Kraja AT, Province MA, Arnett D, Wagenknecht L, Tang W, Hopkins PN, et al. Do inflammation and procoagulation biomarkers contribute to the metabolic syndrome cluster? *Nutr Metab (Lond).* 2007;4:1-12.
3. Malik S, Wong ND, Franklin SS, Kamath TV, L'Italien GJ, Pio JR, et al. Impact of the metabolic syndrome on mortality from coronary heart disease, cardiovascular disease, and all causes in united states adults. *Circulation.* 2004;110:1245-50.
4. Lakka HM, Laaksonen DM, Lakka TA, Niskanen LK, Kumpusalo E, Tuomilehto J, et al. The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. *JAMA.* 2002;288:2709-16.
5. Kerner A, Avizohar O, Sella R, Bartha P, Zinder O, Markiewicz W, et al. Association between elevated liver enzymes and C-reactive protein. Possible hepatic contribution to systemic inflammation in the metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:193-7.
6. Hassinen M, Lakka TA, Komulainen P, Gylling H, Nissinen A, Rauramaa R. C-reactive protein and metabolic syndrome in elderly women. A 12-year follow-up study. *Diabetes Care.* 2006;29:931-2.
7. Ishikawa S, Kayaba K, Gotoh T, Nakamura Y, Kajii E. Metabolic syndrome and C-reactive protein in the general population. JMS cohort study. *Circ J.* 2007;71:26-31.

8. Nishida M, Moriyama T, Ishii K, Takashima S, Yoshizaki K, Sugita Y, et al. Effects of IL-6, adiponectin, CRP and metabolic syndrome on subclinical atherosclerosis. *Clin Chim Acta*. 2007;384:99-104.
9. Picchi A, Gao x, Belmadani S, Potter BJ, Focardi M, Chilian WM, et al. Tumor necrosis factor-alpha induces endothelial dysfunction in the prediabetic metabolic syndrome. *Circ Res*. 2006;99:69-77.
10. Campbell LA, Nosaka T, Rosenfeld ME, Yaraei K, Kuo CC. Tumor necrosis factor alpha plays a role in the acceleration of atherosclerosis by Chlamydia pneumoniae in mice. *Infect Immun*. 2005;73:3164-5.
11. Morré SA, Stooker W, Lagrand WK, van den Brule AJC, Niessen HWM. Microorganisms in the aetiology of atherosclerosis. *J Clin Pathol*. 2000;53:647-54.
12. Nabipour IVK, Jafari SM, Pazoki R, Sandjdideh Z. The association of metabolic syndrome and Chlamydia pneumoniae, Helicobacter pylori, cytomegalovirus, and herpes simplex type I: The Persian Gulf Healthy Heart Study. *Cardiovasc Diabetol*. 2006;5:1-6.
13. Stassen FR, Vainas T, Bruggeman CA. Infection and atherosclerosis. An alternative view on an outdated hypothesis. *Pharmacol Rep*. 2008;60:85-92.
14. Hu H, Pierce G, Zhong G. The atherogenic effects of chlamydia are dependent on serum cholesterol and specific to Chlamydia pneumoniae. *J Clin Invest*. 1999;103:747-53.
15. Mayr M, Metzler B, Kiechl S, Willet J, Schett G, Xu Q, et al. Endothelial cytotoxicity mediated by serum antibodies to heat shock proteins of Escherichia coli and Chlamydia pneumoniae: immune reactions to heat shock proteins as a possible link between infection and atherosclerosis. *Circulation*. 1999;99:1560-6.
16. de Kruif MD, van Gorpa EC, Kellera TT, Ossewaarde JM, ten Cate H. Chlamydia pneumoniae infections in mouse models: relevance for atherosclerosis research. *Cardiovasc Res*. 2005;65:317-27.
17. Laurila A, Bloigu A, Näyhä S, Hassi J, Leinonen M, Saikku P. Chronic Chlamydia pneumoniae infection is associated with a serum lipid profile known to be a risk factor for atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17:2910-3.

18. Loomis WP, Starnbach MN. T cell responses to *Chlamydia trachomatis*. *Curr Opin Microbiol*. 2002;5:87-91.
19. Goh BT, Forster GE. Sexually transmitted diseases in children: chlamydial oculo-genital infection. *Genitourin Med*. 1993;69:213-21.
20. Kalman S, Mitchell W, Marathe R, Lammel CJ, Fan T, Hyman RW, et al. Comparative genomes of *Chlamydia pneumoniae* and *C. trachomatis*. *Nat Genet*. 1999;21:385-9.
21. Yang ZP, Kuo CC, Grayston JT. Systemic dissemination of *Chlamydia pneumoniae* following intranasal inoculation in mice. *J Infect Dis*. 1995;171:736-8.
22. Fryer RH, Schwobe EP, Woods ML, Rodgers GM. *Chlamydia* species infect human vascular endothelial cells and induce procoagulant activity. *J Investig Med*. 1997;45:168-74.
23. Krull M, Kramp J, Klucken AC, Hocke AC, Walter C, Schmeck B, et al. Differences in cell activation by *Chlamydia pneumoniae* and *Chlamydia trachomatis* infection in human endothelial cells. *Infect Immun*. 2004;72:6615-21.
24. Kilic T, Jneid H, Ural E, Oner G, Sahin T, Kozdag G, et al. Impact of the metabolic syndrome on high-sensitivity C reactive protein levels in patients with acute coronary syndrome. *Atherosclerosis*. 2009;207:591-6.
25. Executive summary of the third report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (adult treatment panel III). *JAMA*. 2001;285:2486-97.
26. Bas S, Muzzin P, Vischer TL. *Chlamydia trachomatis* serology: diagnostic value of outer membrane protein 2 compared with that of other antigens. *J Clin Microbiol*. 2001;39:4082-5.
27. Mahony JB, Schachter J, Chernesky MA. Detection of antichlamydial immunoglobulin G and M antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol*. 1983;18:270-5.
28. Ellis R. Infection and coronary heart disease. *J Med Microbiol*. 1997;46:535-9.

29. Siscovick D, Schwartz S, Corey L, Grayston T, Ashley R, Wang S, et al. Chlamydia pneumoniae, herpes simplex virus type 1, and cytomegalovirus and incident myocardial infarction and coronary heart disease death in older adults: The Cardiovascular Health Study. *Circulation*. 2000;102:2335-40.
30. Ervin RB. Prevalence of metabolic syndrome among adults 20 years of age and over, by sex, age, race and ethnicity, and body mass index: United States, 2003-2006. *Natl Health Stat Report*. 2009;5:1-7.
31. Adegoke O, Adedoyin R, Adebayo R, Bisiriyu L, Salawu A. Prevalence metabolic syndrome in a rural community in Nigeria. *Metab Syndr Relat Disord*. Epub 2009 Nov 24.
32. Gupta R, Deedwania P, Gupta A, Rastogi S, Panwar R, Kothari K. Prevalence of metabolic syndrome in an Indian urban population. *Int J Cardiol*. 2004;97:257-61.
33. Franco G, Scala L, Alves C, França G, Cassaneili T, Jardim P. Metabolic syndrome in patients with high blood pressure in Cuiabá - Mato Grosso State: prevalence and associated factors. *Arq Bras Cardiol*. 2009;92:437-42.
34. den Hartog J, Land J, Stassen F, Kessels A, Bruggeman C. Serological markers of persistent *C. trachomatis* infections in women with tubal factor subfertility. *Hum Reprod*. 2005;20:986-90.
35. Wilkowska-Trojnieł M, Zdrodowska-Stefanow B, Ostaszewska-Puchalska I, Zbucka M, Wołczyński S, Grygoruk C, et al. Chlamydia trachomatis urogenital infection in women with infertility. *Adv Med Sci*. 2009;54:82-5.
36. Tuuminen T, Palomäki P, Paavonen J. The use of serologic tests for the diagnosis of chlamydial infections. *J Microbiol Methods*. 2000;42:265-79.
37. Danesh J, Whincup P, Walke M, Lennon L, Thomson A, Appleby P, et al. Chlamydia pneumoniae IgG titres and coronary heart disease: prospective study and meta-analysis. *BMJ*. 2000;321:208-13.
38. Kiechl S, Lgger G, Mayr M, Wiedermann C, Bonora E, Oberhollenzer F, et al. Chronic infection and the risk of carotid atherosclerosis: prospective results from a large population study. *Circulation*. 2001;103:1064-70.

39. LaBiche R, Koziol D, Quinn T, Gaydos C, Azhar S, Ketron G, et al. Presence of *Chlamydia pneumoniae* in human symptomatic and asymptomatic carotid atherosclerotic plaque. *Stroke*. 2001;32:855-60.
40. García-Elorriaga G, Calderón-Abbo M, González-Bonilla C. Association between cardiovascular disease and anti-*Chlamydia pneumoniae* antibodies. *Salud Publica Mex*. 2002;44:243-6.
41. Pinar A, Oç M, Akyön Y, Farsak B, Koçyıldırım E, Us D, et al. The presence of *Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori* and cytomegalovirus in human atherosclerosis detected by molecular and serological methods. *Mikrobiyol Bul*. 2004;38:213-22.
42. Kilic A, Onguru O, Tugcu H, Kilic S, Guney C, Bilge Y. Detection of cytomegalovirus and *Helicobacter pylori* DNA in arterial walls with grade III atherosclerosis by PCR. *Pol J Microbiol*. 2006;55:333-7.
43. Lunardi C, Dolcino M, Peterlana D, Bason C, Navone R, Tamassia N, et al. Endothelial cells activation and apoptosis induced by a subset of antibodies against human cytomegalovirus: relevance to the pathogenesis of atherosclerosis. *PLoS One*. 2007;2:e473.
44. Shi Y, Tokunaga O. Herpesvirus (HSV-1, EBV and CMV) infections in atherosclerotic compared with non-atherosclerotic aortic tissue. *Pathol Int*. 2002;52:31-9.
45. Alber D, Powell K, Vallance P, Goodwin D, Grahame-Clarke C. Herpesvirus infection accelerates atherosclerosis in the apolipoprotein E-deficient mouse. *Circulation*. 2000;102:779-85.
46. Kotronias D, Kapranos N. Herpes simplex virus as a determinant risk factor for coronary artery atherosclerosis and myocardial infarction. *In Vivo*. 2005;19:351-7.
47. Alyan O, Kacmaz F, Ozdemir O, Deveci B, Astan R, Celebi A, et al. Hepatitis C infection is associated with increased coronary artery atherosclerosis defined by modified Reardon severity score system. *Circ J*. 2008;72:1960-5.
48. Ishizaka N, Ishizaka Y, Takahashi E, Toda E, Hashimoto H, Ohuo M, et al. Increased prevalence of carotid atherosclerosis in hepatitis B virus carriers. *Circulation*. 2002;105:1028-30.

49. Zhu J, Quyyumi AA, Norman J, Costello R, Csako G, Epstein S. The possible, role of hepatitis A virus in the pathogenesis of atherosclerosis. *J Infect Dis.* 2000;182:1583-7.
50. Haider A, Wilson P, Larson M, Evans J, Michelson E, Wolf P, et al. The association of seropositivity to *Helicobacter pylori*, *Chlamydia pneumoniae*, and cytomegalovirus with risk of cardiovascular disease: a prospective study. *J Am Coll Cardiol.* 2002;40:1408-13.
51. Tsai C, Kao J, Hus K, Chiang F, Tseng C, Liao C, et al. Relation of *Chlamydia pneumoniae* infection in Taiwan to angiographically demonstrated coronary artery disease and to the presence of acute myocardial infarction or unstable angina pectoris. *Am J Cardiol.* 2001;88:960-3.
52. Köksal A, Ekmekçi Y, Karadeniz Y, Köklu S, Apan T, Yilmaz M, et al. *Helicobacter pylori* seropositivity and atherosclerosis risk factors. *Dig Dis.* 2004;22:386-9.
53. Auer J, Leitinger M, Berent R, Prammer W, Weber T, Lassnig E, et al. Hepatitis A IgG seropositivity and coronary atherosclerosis assessed by angiography. *Int J Cardiol.* 2003;90:175-9.
54. Caliskan Y, Oflaz H, Pusuroglu H, Boz H, Yazici H, Tamer S, et al. Hepatitis C virus infection in hemodialysis patients is not associated with insulin resistance, inflammation and atherosclerosis. *Clin Nephrol.* 2009;71:147-57.
55. Yang K, Chen M, Su T, Jeng J, Hwang B, Lin L, et al. Hepatitis B virus seropositivity is not associated with increased risk of carotid atherosclerosis in Taiwanese. *Atherosclerosis.* 2007;195:392-7.
56. Haberbosch W, Jantos C. *Chlamydia pneumoniae* infection is not an independent risk factor for arterial disease. *Herz.* 2000;25:79-83.
57. Fan Y, Wang S, Yang X. *Chlamydia trachomatis* (mouse pneumonitis strain) induces cardiovascular pathology following respiratory tract infection. *Infect Immun.* 1999;67:6145-51.
58. Hatch G, McClarty G. C. *trachomatis*-infection accelerates metabolism of phosphatidylcholine derived from low density lipoprotein but does not affect phosphatidylcholine secretion from hepatocytes. *BMC Microbiol.* 2004;4:8.

59. Blessing E, Nagano S, Campbell L, Rosenfeld M, Kuo C. Effect of Chlamydia trachomatis infection on atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Infect Immun.* 2000;68:7195-7.
60. Mavrogeni SM, Spargias K, Kolovou G, Saroglu G, Cokkinos DV. Myocardial involvement in a patient with Chlamydia trachomatis infection. *J Card Fail.* 2008;14:351-3.
61. Bachmaier K, Neu N, de la Maza L, Pal S, Hessel A, Penninger J. Chlamydia infections and heart disease linked through antigenic mimicry. *Science.* 1999;283:1335-9.
62. Pfister G, Stroh CM, Perschinka H, Kind M, Knoflach M, Hinterdorfer P, et al. Detection of HSP60 on the membrane surface of stressed human endothelial cells by atomic force and confocal microscopy. *J Cell Sci.* 2005;118:1587-94.
63. Kol A, Bourcier T, Lichtman A, Libby P. Chlamydial and human heat shock protein 60s activate human vascular endothelium, smooth muscle cells, and macrophages. *J Clin Invest.* 1999;103:571-7.
64. Xu Q, Amberger A, Van der Zee R, Recheis H, Willeit J, Wick G, et al. Autoantibodies against heat shock protein 60 mediate endothelial cytotoxicity. *J Clin Invest.* 1995;96:2569-77.
65. Mandal K, Foteinos G, Jahangiri M, Xu Q. Role of anti heat shock protein 60 autoantibodies in atherosclerosis. *Lupus.* 2005;14:742-6.
66. Halme S, Syrjälä H, Bloigu A, Saikku P, Leinonen M, Airaksinen J, et al. Lymphocyte responses to Chlamydia antigens in patients with coronary heart disease. *Eur Heart J.* 1997;18:1095-101.
67. Cappello F, Conway de Macario E, Di Felice V, Zummo G, Macario A. Chlamydia trachomatis infection and anti-Hsp60 immunity: the two sides of the coin. *PLoS Pathog.* Epub 2009 Aug 28.
68. Franck M, Staub H, Petracco J, Norman G, Lassen A, Schiavo N, et al. Autoantibodies to the atheroma component beta2-glycoprotein I and risk of symptomatic peripheral artery disease. *Angiology.* 2007;58:295-302.

69. Staub H, Norman G, Crowther T, Cunha V, Polanczyk A, Bohn J, et al. Antibodies to the atherosclerotic plaque components beta2-glycoprotein and heat shock proteins as risk factors for acute cerebral ischemia. *Arq Neuropsiquiatr*. 2003;61:757-63.
70. Lottermann A, Ranzolin A, von Muhlen C, Staub H. Anticorpos contra proteína de choque térmico, autoimunidade e aterosclerose. *Rev Bras Reumatol*. 2003;43:302-8.
71. Gromadzka G, Zielinska J, Ryglewicz D, Fiszer A, Członkowska A. Elevated levels of anti-heat shock protein antibodies in patients with cerebral ischemia. *Cerebrovasc Dis*. 2001;12:295-9.
72. Xu Q, Kiechl S, Mayr M, Metzler B, Egger G, Oberhollenzer F, et al. Association of serum antibodies to heat-shock protein 65 with carotid atherosclerosis: clinical significance determined in a follow-up study. *Circulation*. 1999;100:1169-74.
73. Xu Q, Willeit J, Maroé M, Kleindienst R, Oberhollenzer F, Kiechl S, et al. Association of serum antibodies to heat-shock protein 65 with carotid atherosclerosis. *Lancet*. 1993;341:255-9.
74. Bachmaier K, Penninger J. Chlamydia and antigenic mimicry. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2005;296:153-63.
75. Jha H, Prasad J, Mittal A. High immunoglobulin A seropositivity for combined Chlamydia pneumoniae, Helicobacter pylori infection, and high-sensitivity C-reactive protein in coronary artery disease patients in India can serve as atherosclerotic marker. *Heart Vessels*. 2008;23:390-6.
76. Nishimura M, Hashimoto T, Kobayashi H, Fukuda T, Okino K, Yamamoto N, et al. Close association of Chlamydia pneumoniae IgA seropositivity by ELISA with the presence of coronary artery stenosis in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2005;20:1944-50.
77. Stone A, Mendall M, Kaski JC, Edger TM, Risley P, Poloniecki J, et al. Effect of treatment for Chlamydia pneumoniae and Helicobacter pylori on markers of inflammation and cardiac events in patients with acute coronary syndromes: South Thames Trial of Antibiotics in Myocardial Infarction and Unstable Angina (STAMINA). *Circulation*. 2002;106:1219-23.
78. Gurfinkel E, Bozovich G, Daroca A, Beck E, Mautner B. Randomised trial of roxithromycin in non-Q-wave coronary syndromes: ROXIS Pilot Study. ROXIS Study Group. *Lancet*. 1997;350:404-7.

79. Jaff M, Dale R, Creager MA, Lipicky RJ, Constant J, Campbell LA, et al. Anti-chlamydial antibiotic therapy for symptom improvement in peripheral artery disease: prospective evaluation of rifalazil effect on vascular symptoms of intermittent claudication and other endpoints in *Chlamydia pneumoniae* seropositive patients (PROVIDENCE-1). *Circulation*. 2009;119:452-8.

ANEXOS

ANEXO A - Termo de consentimento livre e esclarecido

ANTICORPOS CONTRA *Chlamydia trachomatis* e SÍNDROME METABÓLICA

Colaborador: Luciele Sehnem

Pesquisador Responsável: Prof^o. Dr. Henrique Luiz Staub

Telefone para contato: (51) 9803-0241

Justificativa e objetivo da pesquisa.

Síndrome Metabólica é o conjunto de fatores de risco que levam ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares. A *Chlamydia trachomatis* é uma bactéria causadora de infecções crônicas e pode estar ligada a síndrome metabólica e doenças cardiovasculares.

Justificativa: Os potenciais “gatilhos” infecciosos para SM foram incompletamente estudados até o momento. Desta forma, é de interesse avaliar a frequência de anticorpos anti-*Chlamydia trachomatis* de memória (IgG) e de fase aguda (IgA) em pacientes com SM associada ou não a eventos cardiovasculares comparativamente a controles sadios.

Objetivo: Avaliar a prevalência de anticorpos IgG e IgA anti-*Chlamydia trachomatis* em pacientes com SM com e sem evento cardiovasculares prévios, comparados a controles sadios.

Dos procedimentos.

O meio que vamos usar para realizar a pesquisa de anticorpos se dá através de soro humano, isto é, da coleta de 5 ml do seu sangue. Este sangue total obtido de você será separado e analisado em laboratório.

Riscos e benefícios.

A coleta para exames do seu sangue não envolve riscos, desde que os materiais empregados sejam descartáveis, o local de coleta vai ser limpo e livre de contaminações. Pode-lhe ocorrer algum tipo de desconforto causado pela ansiedade ou pela necessidade do jejum, podendo ocorrer tonturas ou mesmo desmaios. Mas este procedimento é importante para contribuição da pesquisa e da ciência.

Dúvidas, privacidade e abandono da pesquisa.

Ressaltamos também que a concordância em participar deste estudo não implica necessariamente em qualquer modificação no seu tratamento, nem tampouco os resultados destes exames terão efeitos sobre ele. Da mesma forma, a não concordância em participar deste estudo não irá alterar de nenhuma maneira seu tratamento já estabelecido.

Eu,.....
. fui informado dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada. Recebi informação a respeito do tratamento recebido e esclareci minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão se assim eu o desejar. A pesquisadora Luciele Sehnem certificou-me de que todos os dados desta pesquisa

referentes ao resultado dos exames serão confidenciais, bem como o seu tratamento não será modificado em razão desta pesquisa e terei liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa, face a estas informações.

Caso tiver novas perguntas sobre este estudo, posso chamar a **Luciele Sehnem** no telefone **(51) 9803-0241**. Para qualquer pergunta sobre os meus direitos como participante deste estudo ou se penso que fui prejudicado pela minha participação, posso em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) através do telefone **(51) 3320-3345**.

Declaro que recebi cópia do presente Termo de Compromisso.

_____	_____	_____
Assinatura do Paciente	Nome	Data
_____	_____	_____
Assinatura do Pesquisador	Nome	Data

Este formulário foi lido para o paciente

em ___/___/_____ pela pesquisadora Luciele Sehnem enquanto eu estava presente.

_____	_____	_____
Assinatura da testemunha	Nome	Data

**ANEXO B - Carta de aprovação do comitê de ética em pesquisa da
PUCRS**



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

OF.CEP-1008/09

Porto Alegre, 07 de agosto de 2009.

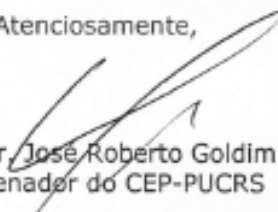
Senhor Pesquisador,

O Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa registro CEP 08/04483 intitulado "**Anticorpos contra *Chlamydia trachomatis* em pacientes com síndrome metabólica**".

Sallentamos que seu estudo pode ser iniciado a partir desta data.

Os relatórios parciais e final deverão ser encaminhados a este CEP.

Atenciosamente,


Prof. Dr. José Roberto Goldim
Coordenador do CEP-PUCRS

Ilmo. Sr.
Dr. Henrique Luiz Staub
Nesta Universidade

PUCRS

Campus Central
Av. Ipiranga, 6690 - 3º andar - CEP: 90610-000
Sala 314 - Fone Fax: (51) 3320-3345
E-mail: cep@pucrs.br
www.pucrs.br/prppg/cep

ANEXO C - Cópia do artigo submetido ao journal of biomedical science – 1021-7770**Antibodies to *Chlamydia trachomatis* and metabolic syndrome**

Luciele Sehnem^{1§}, Luiz Carlos Bodanese^{2,3*}, Giuseppe Repetto^{4*}, Henrique L. Staub^{3*}

¹*Department of Nursing and Dentistry, Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC), Santa Cruz do Sul, RS, Brazil*

²*Cardiology Department, Hospital São Lucas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, Brazil.*

³*Postgraduate Program, School of Medicine, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil.*

⁴*Endocrinology Department, Hospital São Lucas, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil.*

*These authors contributed equally to this work

§Corresponding author

Correspondence author: Luciele Sehnem

480 Osvaldo Aranha street, Apto 201

Santa Cruz do Sul/RS – Brasil 96820-150

E-mail: lucielesehnem@unisc.br

Email addresses:

LS: lucielesehnem@unisc.br

LCB: lcbodanese@puhrs.br

GR: giusepperepetto@puhrs.br

HLS: henrique.staub@puhrs.br

ABSTRACT

Background: The metabolic syndrome (METS) comprises a cluster of risk factors for atherosclerotic disease. Pathogens such as *Chlamydia pneumoniae* and *Helicobacter pylori* may be involved on triggering and perpetuation of atherogenesis, but their relationship with METS is rather unknown. Exposition to *Chlamydia trachomatis* (CT) in patients with METS has been unexplored in the literature up to date. The objective is to evaluate the association, if any, of IgA and IgG anti-CT antibodies and occurrence of METS.

Methods: In this cross-sectional study, patients with METS with and without previous cardiovascular disease and age and age and sex-matched controls were evaluated. METS diagnosis was based on NCEP criteria. IgA and IgG anti-CT antibodies were detected by immunoenzymatic assay; titers above 1.1 units were considered as positive. The chi-squared test was utilized for comparison of categoric variables, and the t test for continuous variables. To estimate the association of anti-CT antibodies and METS, odds ratios were calculated. Logistic regression was utilized for adjustment of age and sex.

Results: The total survey included 238 individuals: 101 patients (42.5%) with METS without cardiac events; 47 (19.7%) with METS and previous cardiac events; and 90 (37.8%) healthy controls. Females predominated in the 3 groups of patients. The global mean age was 59.7 years. The prevalence of a positive test for IgA anti-CT was higher in patients with METS (17%) than in controls (6%) ($P=0.015$). Elevated levels of IgA anti-CT associated significantly with occurrence of METS in comparison to healthy controls after adjustment for sex and age (OR=3.4; CI95% 1.2-9.4; $P=0.015$). In the subgroup analysis, elevated levels of IgA anti-CT were more prevalent in non-complicated METS than in controls ($P=0.013$). After adjustment for age and sex, the association of IgA anti-CT with non-complicated METS remained defined (OR=3.6; CI95% 1.32-10.2; $P=0.015$).

Conclusions: IgA anti-CT antibodies, possibly of acute phase, were more prevalent in METS than in healthy controls. A positive test for IgA anti-CT associated particularly to non-complicated METS. The role of such IgA response in patients with METS should be detailed in forecoming studies.

INTRODUCTION

Metabolic Syndrome (METS) is a combination of abdominal obesity, arterial hypertension and glycolipid metabolism abnormalities. The *National Cholesterol Education Programme Adult Treatment Panel III* (NCEP ATP III) considers METS a proinflammatory and prothrombotic state culminating in cardiovascular diseases. Thus, METS is considered a proatherogenic entity. The prevalence of METS in the United States is estimated as 24% of the adult population[1-3]. The association between METS and cardiovascular disease (particularly in males) was confirmed by Lakka *et al* (2002)[4].

METS is notable for generating a chronic inflammatory response[5]. Adipocytes of patients with METS are known to synthesize proinflammatory cytokines as tumor necrosis factor (TNF) and interleukin 6 (IL-6); these in turn stimulate the production of C-reactive protein (CRP) by the hepatocytes[6-9].

Intravascular inflammation plays a relevant role in triggering atherogenesis. There are signs that infectious agents can predispose to the development of atherosclerosis and cardiovascular events. Exposure to pathogens such as herpes virus type 1, hepatitis A, B and C virus, cytomegalovirus, *Helicobacter pylori* and *Chlamydia pneumoniae* could be involved in triggering atherosclerotic disease[10-13]. Murine infection by *Chlamydia pneumoniae* of the AR39 subtype significantly exacerbated the aortic atheromatosis in the presence of hypercholesterolemia[14].

Thermal shock proteins (Hsp) from pathogens such as *Chlamydia pneumoniae* are highly homologous with 60 kilodalton (kDa) endothelial Hsp. Endothelial Hsp in turn participate directly in atherogenesis when they stimulate the migration of smooth muscle cells to the intima layer and activate monocytes. Cross-reactive anti-Hsp antibodies could speed up autoimmune endothelial damage[15].

A possible proatherogenic effect which can be attributed to exposure to gram-negative genus *Chlamydia* bacteria is far from being clearly understood[16,17]. *Chlamydia* are obligatory intracellular pathogens, with a biphasic life cycle. In the extracellular medium their elementary bodies can activate the macrophagic and lymphocytary system, with the consequent release of proinflammatory cytokines such as TNF and gamma-interferon[18].

Chlamydia trachomatis (CT), with predominantly sexual transmission, may cause eye infections such as trachoma and urogenital infections[19]. In turn, exposure to *Chlamydia pneumoniae* causes respiratory tropism infections. The comparative analysis of genomes of

the two species shows that 214 pre-protein sequences of *Chlamydia pneumoniae* are not found in the genome of CT, which might explain the different biological behavior of the two species[20].

There are signs that *Chlamydia pneumoniae* may infect endothelial cells, smooth muscle cells, macrophages and lymphocytes, all of them involved in atherogenesis[21]. Importantly, CT subtypes H and L also infect human endothelial cells in a culture; the endothelial exposure to these species of *Chlamydia* induces a procoagulant state manifested by the hyperexpression of tissue factor[22]. Although other authors confirmed infection of endothelial cells by CT, they did not observe the synthesis of IL-8 and adenes by the endothelium under these circumstances, differently from what occurred when there was exposure to *Chlamydia pneumoniae*[23].

The possible participation of genus *Chlamydia* bacteria in the atherogenic process is quite polemical. It is possible if these bacteria are associated with intravascular autoimmune phenomena via the expression of Hsp homologous to the endothelial ones. A direct effect of these pathogens on the endothelial wall can also not be ruled out.

Most of the studies directed at the CT-vascular damage binomial are based on animal models, or series of case. There are few observational studies which evaluated exposure to CT in patients with atherosclerotic disease. In METS, the main focus of this study, the role of infection by CT has not yet been analyzed. METS, as a proinflammatory and prothrombotic entity[24], seems appropriate to us for the study of the CT-vasculopathy relationship.

In this context, we aim to evaluate the prevalence of acute phase antibodies (IgA) and memory antibodies (IgG) against CT in metabolic patients, with and without prior cardiovascular events. This dichotomization of patients with METS may allow us to reach more detailed conclusions about the role of CT in this context. At the same time we will evaluate whether a positive test for anti-CT IgA or IgG is associated with the occurrence of METS.

METHODS

Population

The controlled cross-sectional study included individuals with METS who are being followed at the Outpatient Clinic for Cardiometabolic Risk at Hospital São Lucas of the Pontifical Catholic University-PUCRS (HSL-PUCRS). The sample was selected independently of sex or race. It was divided into three groups: patient with METS without cardiac events, patients with METS with a prior cardiac event (acute myocardial infarction, acute coronary syndrome, history of myocardial revascularization surgery) and controls. The confirmation of cardiac events was obtained by looking at the medical files.

In order to diagnose METS, the classical criteria of NCEP[25] were followed, where at least three of the characteristics below were present: abdominal circumference ≥ 102 cm if male or ≥ 88 cm if female; triglyceride serum levels ≥ 150 mg/dl; high density lipoprotein (HDL) serum levels of cholesterol < 40 mg/dl if male or < 50 mg/dl if female; blood pressure $\geq 130/85$ mmHg; fasting glycemia ≥ 100 mg/dl.

The group of controls, paired by sex and age, was selected at the Hospital São Lucas (HSL) blood bank at PUCRS. The controls were tested in the Pathology Laboratory of HSL/PUCRS for HDL, glucose and triglycerides, besides the routine immunological tests (anti-HIV 1/2, anti-HCV, anti-HTLV, Chagas, VDRL, HbsAg and anti-Hbc). Individuals who presented three or more diagnostic criteria for METS according to NCEP²⁵ were excluded from this group. The clinical and demographic data were obtained by filling out a form during an interview with donors or family members, and the following characteristics were considered: age, sex and history of coronary artery disease. All individuals in the study agreed to participate in the research on presenting the Letter of Free and Informed Consent.

Serology

The blood samples (5 ml) were collected from a peripheral vein, centrifuged to obtain the serum and frozen up to 2 hours after collection. They were then stored at -70°C for later immunoenzymatic testing.

The serology was performed in the Immunology Laboratory at HSL-PUCRS. Antibodies of IGA and IgG isotopes against *Chlamydia trachomatis* were evaluated using an immunoenzymatic assay (ELISA) with the *Chlamydia trachomatis* IgA and IgG - SYM commercial kit of ALKA[®] – Tecnologia em Diagnóstico, São Paulo, Brazil. The CT antigen linked to the solid phase of the plate was the external protein of the membrane. The

liposaccharid responsible for most of the cross-reactions with other species of *Chlamydia* was not included in the microplate. In brief, 5 µl of the patient's serum and of the positive and negative controls (in duplicate) were placed in the microplate wells and diluted in 100 µl of dilutant of the samples containing a phosphate buffer with protein stabilizer. Then the plate was incubated in an oven at 37°C for 45 minutes. The microplate was then submitted to 5 washings, in which unspecific antibodies were eliminated. Next, 100 µl of the enzymatic conjugate (human anti-IgA or anti-IgG solution conjugated with peroxidase) were added to all the microplate wells; the plate was then incubated again at 37°C for 30 minutes. After five washings, 100 µl of colorless substrate were placed in all the wells. The microplate was then incubated in the dark at ambient temperature for 20 minutes. Fifty µl of the stop solution were added. The results were obtained after test validation, depending on sample absorbance, evaluated by spectrophotometry with a 450/620nm wavelength. The color intensity obtained with samples from patients with METS was compared to that of the controls. Titers were considered positive when above 1.1 units for the two isotypes and negative when below 0.9 units for both isotypes[26,27].

Statistical methods

The confidence interval (CI) based on binomial distribution was used in the analysis of proportion. The Chi-squared test was used to compare the categorical variables, and the Student t test to compare the continuous variables. In order to estimate the degree of association between anti-CT antibodies and METS outcome, odds ratios (OR) with a confidence interval of 95% (CI95%) were calculated. Logistic regression was used to adjust the confounding factors (sex and age). The data were analyzed with the help of the *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) for Windows program, version 11.5, Chicago, IL.

Ethical Considerations

The research project in this study was submitted to the Ethics in Research Committee of the Medical School at PUCRS, and approved on August 7, 2009, registered under number OF.CEP-1008/09.

RESULTS

The overall sample of the study was 238 individuals (72.3% women, $P < 0.0001$). One hundred and one patients comprised the METS group without prior cardiac events (METSwoE); 47 patients presented METS and prior cardiac events (METSwe), and 90 individuals comprised the group of healthy controls. Females predominated in the 2 groups with METS, and this information was not significant in the comparison with healthy controls. The overall mean age was 59.7 (± 9.9 SD); in patients with METS as a whole, the mean age was 60.2 years. There was no significant difference in the mean age between the groups of patients with METS and controls. These data are summarized in [table 1](#).

The prevalence of anti-CT IgA and IgG, as well as the association between these antibodies and METS after adjustment for sex and age by logistic regression, is shown in [table 2](#). High levels of anti-CT IgA were detected considerably more in patients with METS than in healthy controls. The occurrence of a positive test for anti-CT IgA was significantly associated with METS.

The frequency of positivity for anti-CT antibodies was compared in the 3 groups of individuals ([table 3](#)). The positive test frequency for anti-CT IgA was significant in patients with METSwoE compared to the healthy controls; there was no significant difference in the other comparisons between the three groups.

After adjusting for sex and age in a logistic regression model, OR were obtained for anti-CT IgG and IgA antibodies in the different comparisons between the three groups of individuals. The effect of these adjustments using logistic regression in OR can be seen in [table 4](#). A positive test for anti-CT IgA was associated significantly with the occurrence of METSwoE when these were compared to healthy controls. The association involving anti-CT IgA was not confirmed when individuals with METSwe were compared to healthy controls, or when the 2 groups of patients with METS were compared to each other. The occurrence of a positive test for anti-CT IgG was not associated with METS in any of the combinations tested.

DISCUSSION

The role of pathogens on the atherogenesis process has caused great controversy in the scientific community in recent years[28]. The relationship of METS, a proatherogenic entity, with infectious agents has not been much studied so far; possibly pathogens contribute directly or indirectly to atheroma formation[29]. It is known that *Chlamydia* microorganisms, including CT, can infect endothelial cells[22,23].

Our study evaluated the frequency of anti-CT IgA and IgG antibodies in patients with METS. A subgroup of our patients was in a preatherosclerotic situation (non-complicated METS), while the other subgroup presented a history of cardiovascular problems. This stratification of patients with METS enabled us to present a few hypotheses that are of interest. At the same time, we looked at the association between a positive test for anti-CT antibodies and the occurrence of METS.

The overall cases of the study included 238 individuals (two thirds female). Women predominated in both groups of patients with METS (non-complicated and with a cardiovascular history). The controls were paired by sex. Predominance by sex in patients with METS has not been defined in the literature; METS can prevail among males[30], occur without differences in both sexes[31] or, as in our study, predominate in females[32]. This discrepancy of findings can be explained by the selection of the samples and design of the studies[30-32].

The mean age of our global sample was around 59 years (around 60 years in the METS group). The controls group was paired by age, which implied equity in the distribution of the mean ages in individuals with METS and controls. The mean age group of our patients with METS agrees with the data of other studies[32,33]. METS occurred more between the age of 55 and 64 years and increased with age, according to a Latin-American study[1].

Considering the total population of patients with METS compared to healthy controls, high levels of anti-CT IgA (but not of IgG) were considerably more frequent in the target population. The OR obtained after adjusting for sex and age (3.4; CI95% 1.2-9.4; P=0.015) indicated an association of a positive test for anti-CT IgA with METS. In another rare study involving infectious agents and METS, IgG anti-*Chlamydia pneumoniae* was significantly associated with METS in an Iranian population; anti-CT antibodies were not evaluated[12].

Our data indicated that a positive test for anti-CT IgA was more prevalent in the population of patients with non-complicated METS than in healthy controls ($P=0.013$). When we compared patients with complicated METS and controls, there was no significant difference in positivity for CT IgA; it is thus inferred that the overall association between anti-CT IgA and METS was based on the greater positivity of the subgroup of non-complicated patients.

After adjustments for sex and age, we found that a positive test for anti-CT IgA was significantly associated with non-complicated METS when compared to healthy controls ($OR=3.6$; $CI_{95\%} 1.32-10.2$; $P=0.015$). This did not occur when patients with METS associated with prior events were compared to controls, or when the two metabolic populations were mutually compared. Interestingly, a positive test for anti-CT IgG was not associated with the occurrence of any of the two METS sub-groups.

Our option of testing isotype IgA as a presumably acute phase antibody is based on the tropism of CT by mucous membranes. Recent data corroborate the testing of anti-CT IgA in urogenital infections[34,35]. Although the accuracy of the serological methods (indirect immunofluorescence, immunoenzymatic assay) to detect anti-CT antibodies is a matter of debate, serology is still preferable to other methods under these circumstances[36]. We chose the immunoenzymatic method due to the availability of this assay at our Hospital.

The exacerbated anti-CT IgA response seen in our patients with METS was not previously described in the literature. This antibody response may reflect an exposure to the pathogen during the acute phase. Memory isotypes (IgG) were not significantly detected in our METS patients, which would theoretically increase the possibility of a recent IgA response in these individuals.

The reasons why the anti-CT IgA response predominated in our patients with non-complicated METS are unknown. An hypothesis we could postulate is that the infectious “trigger” that generates the IgA response could be selectively present before the event, tending to disappear after the ischemic episode. The reasons why the IgA response becomes undetectable in patients with cardiac events are also unknown, but could include the clearance of the IgA-CT complex by macrophages, during or right after the ischemic event, or else the incapacity to generate humoral response post ischemic event.

An ethiopathogenic role has been postulated for infectious agents in established atherosclerotic disease, but the intrinsic mechanisms of this relationship are unknown[35,37-39]. The agents commonly associated with atherosclerosis include *Chlamydia pneumoniae*[40,41], *Helicobacter pylori*[41,42], cytomegalovirus[43,44], herpes virus[45,46]

and hepatitis A, B and C virus[47-49]. In contrast, other authors reported the absence of association between atherosclerotic disease and exposure to *Chlamydia pneumoniae*[50,51], *Helicobacter pylori*[50,52], cytomegalovirus[42,50], herpes virus[51] or hepatitis virus[53-55]. *Chlamydia pneumoniae* infection can be considered a contributing factor to atherogenesis, but not an independent risk factor for atherosclerotic disease[56].

Our subgroup of patients with METS and prior cardiac events conceptually comprises individuals with established atherosclerosis. In this specific subpopulation, the prevalence of anti-CT IgA and IgG was not increased in comparison to controls, and a positive test for the two isotypes was not associated with the outcome. There is a notable scarcity of literature on the association of anti-CT antibodies and established atherosclerotic disease.

Murine exposure to CT was able to trigger respiratory infection and later cardiovascular disease[57]. The phosphatidylcholine metabolism derived from LDL is accelerated in the presence of CT infection[58]. It is noteworthy that nasal exposure of apolipoprotein E-deficient murines to *Chlamydia pneumoniae* accelerated aortic atheromatosis; when the animals were inoculated with CT, the inflammatory changes in the aorta were mild and transient[59]. Mavrogeni *et al* (2008) documented the presence of myocardioathy in a patient infected by CT and with a history of recurrent prostatitis[60].

A molecular mimicry mechanism is a plausible explanation for the possible pathogenicity of anti-CT antibodies in patients with METS and atheromatosis. In this context, 60 kDa proteins of the external membrane (probably Hsp) of several species of *Chlamydia* mimic peptidic sequences of cardiac myosin; immunization of murines with this peptide induced myocardioathy, probably due to a cross-reactive humoral response[61].

The detection of Hsp60 on the surface of activated endothelial cells was recently confirmed by focal microscopy[62]. Hsp60 derived from *Chlamydia*, as well as human Hsp60, can activate endothelial cells, smooth muscle cells and macrophages[63]. An anti-Hsp60 humoral response may be cytotoxic to the endothelium according to data from 1995[64]. Anti-Hsp50 antibodies can stimulate the synthesis of proinflammatory cytokines by the endothelium, and high levels of this antibody were associated with the severity of the atherosclerotic process[65]. In men with coronary disease, apart from exacerbated anti-*Chlamydia pneumoniae* IgA and IgG responses, a marked cell response to CT antigens was documented[66].

It could be accepted that the IgA antibody response observed in our METS patients reflects humoral activity against Hsp from CT, and by molecular homology also against

endothelial Hsp60. Indeed, recent data indicate that in patients with persistent infection by CT, autoimmunity and atherogenesis may result from an antibody response directed to endothelial Hsp60. On the other hand, tumor cells expressing surface Hsp60 can be lysed by cross-reactive antibodies; in the latter circumstance, in patients exposed to CT, a cross-reactive anti-Hsp response could be protective for neoplasms[67].

In recent years, our research group evaluated a possible association of IgG antibodies against human Hsp60 and mycobacterial Hsp65 with atherosclerotic disease. Elevated levels of anti-Hsp60 showed a defined and independent association with peripheral arterial disease[68]. Anti-Hsp60 and anti-Hsp65 also independently associated with acute cerebral ischemic disease[69], but not with acute myocardial infarction[70]. Other authors confirmed an independent association of anti-Hsp65 antibodies with ischemic cerebral vascular disease[71] and obstructive carotid disease[72,73].

Also of interest, other CT components, that are not Hsp, can mimic human proteins and be the target of cross-reactive antibodies. This is the case of DNA primase of CT[74].

The relationship of anti-CT antibodies, METS and atherosclerosis warrants further studies. Currently the data are insufficient to define diagnostic and therapeutic implications. As to the *Chlamydia pneumoniae*- atherosclerotic disease binomial, not discussed in this study, IgA antibodies to this pathogen were associated with the occurrence of coronary stenosis according to two studies[75,76].

The data concerning antibiotic therapy for *Chlamydia pneumoniae* in patients with established atherosclerotic disease are in conflict. Twelve weeks of treatment with antibiotics reduced cardiac events in patients with acute coronary syndromes by 36%, after 1 year of observation[77].

In another study, the effect of treatment with macrolide antibiotics was short-lived in patients with angina pectoris[78]. In peripheral arterial disease, the use of rifalazil, a powerful anti-*Chlamydia pneumoniae* drug, did not modify the quality of life of patients compared to controls[79]. Data on a possible treatment for CT infection in patients with METS or atherosclerotic disease, not available at this point, are expected for the future.

Study limitations

Although the comparative results indicate that the elevated levels of anti-CT IgA are more frequent in METS than in healthy controls, we should emphasize that the overall prevalence of a positive antibody test was relatively small (17%). Moreover, test positivity in healthy controls was not negligible (6%). Although the total number of controls was not exactly small, it was smaller than the overall number of patients with METS, and this is certainly one of the limitations of our study. However, the numerical difference in relation to the controls practically disappears when analyzing subgroups of patients with METS.

Even though the individuals in our control group did not fulfill the classical criteria for METS, the possible occurrence of isolated stigmata of METS in these individuals is another limitation of our study. Not obtaining data referring to race in the controls made it impossible to adjust for this variable in the statistical analysis.

Finally, we admit that if we had tested for both anti-CT antibodies and antibodies against Hsp60 (human and /or of *Chlamydia*), we could have obtained data of interest in the interpretation of this intriguing anti-CT IgA response seen in METS. Further studies are needed to explain the ethiopathogenic role of anti-CT IgA response in these individuals.

CONCLUSIONS

I) The prevalence of IgA anti-CT, but not of anti-CT IgG antibodies, was significantly higher in patients with METS than in healthy controls matched by sex and age;

II) The occurrence of anti-CT antibodies was associated with the presence of METS as a whole;

III) The IgA anti-CT response, presumably of the acute phase, predominated in patients with non-complicated metabolic syndrome as compared to healthy controls;

IV) A positive test for IgA anti-CT was associated with the presence of non-complicated METS, independent of sex and age.

COMPETING INTERESTS

The author(s) declare that they have no competing interests.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank The Company ALKA - Technology in Diagnosis, Laboratory of Pathology, at Hospital São Lucas of the Pontifical Catholic University-PUCRS and Clinic for Cardiometabolic Risk at Hospital São Lucas of PUCRS and Dr. Mário Wagner for statistical work.

REFERENCES

1. Escobedo J, Schargrotsky H, Champagne B, Silva H, Boissonnet CP, Vinueza R, et al: **Prevalence of the Metabolic syndrome in Latin America and its association with sub-clinical carotid atherosclerosis: the CARMELA cross sectional study.** *Cardiovas Diabetol* 2009, **8**:1-9.
2. Kraja AT, Province MA, Arnett D, Wagenknecht L, Tang W, Hopkins PN, et al: **Do inflammation and procoagulation biomarkers contribute to the metabolic syndrome cluster?** *Nutr Metab (Lond)* 2007, **4**:1-12.
3. Malik S, Wong ND, Franklin SS, Kamath TV, L'Italien GJ, Pio JR, et al: **Impact of the metabolic syndrome on mortality from coronary heart disease, cardiovascular disease, and all causes in united states adults.** *Circulation* 2004, **110**:1245-50.
4. Lakka HM, Laaksonen DM, Lakka TA, Niskanen LK, Kumpusalo E, Tuomilehto J, et al: **The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men.** *JAMA* 2002, **288**:2709-16.
5. Kerner A, Avizohar O, Sella R, Bartha P, Zinder O, Markiewicz W, et al: **Association between elevated liver enzymes and C-reactive protein. Possible hepatic contribution to systemic inflammation in the metabolic syndrome.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005, **25**:193-7.
6. Hassinen M, Lakka TA, Komulainen P, Gylling H, Nissinen A, Rauramaa R: **C-reactive protein and metabolic syndrome in elderly women. A 12-year follow-up study.** *Diabetes Care* 2006, **29**:931-2.

7. Ishikawa S, Kayaba K, Gotoh T, Nakamura Y, Kajii E: **Metabolic syndrome and C-reactive protein in the general population. JMS cohort study.** *Circ J* 2007, **71**:26-31.
8. Nishida M, Moriyama T, Ishii K, Takashima S, Yoshizaki K, Sugita Y, et al: **Effects of IL-6, adiponectin, CRP and metabolic syndrome on subclinical atherosclerosis.** *Clin Chim Acta* 2007, **384**:99-104.
9. Picchi A, Gao X, Belmadani S, Potter BJ, Focardi M, Chilian WM, et al: **Tumor necrosis factor-alpha induces endothelial dysfunction in the prediabetic metabolic syndrome.** *Circ Res* 2006, **99**:69-77.
10. Campbell LA, Nosaka T, Rosenfeld ME, Yaraei K, Kuo CC: **Tumor necrosis factor alpha plays a role in the acceleration of atherosclerosis by Chlamydia pneumoniae in mice.** *Infect Immun* 2005, **73**:3164-5.
11. Morr  SA, Stooker W, Lagrand WK, van den Brule AJC, Niessen HWM: **Microorganisms in the aetiology of atherosclerosis.** *J Clin Pathol* 2000, **53**:647-54.
12. Nabipour IVK, Jafari SM, Pazoki R, Sandjdideh Z: **The association of metabolic syndrome and Chlamydia pneumoniae, Helicobacter pylori, cytomegalovirus, and herpes simplex type I: The Persian Gulf Healthy Heart Study.** *Cardiovasc Diabetol* 2006, **5**:1-6.
13. Stassen FR, Vainas T, Bruggeman CA: **Infection and atherosclerosis. An alternative view on an outdated hypothesis.** *Pharmacol Rep* 2008, **60**:85-92.
14. Hu H, Pierce G, Zhong G: **The atherogenic effects of chlamydia are dependent on serum cholesterol and specific to Chlamydia pneumoniae.** *J Clin Invest* 1999, **103**:747-53.
15. Mayr M, Metzler B, Kiechl S, Willet J, Schett G, Xu Q, et al: **Endothelial cytotoxicity mediated by serum antibodies to heat shock proteins of Escherichia coli and Chlamydia pneumoniae: immune reactions to heat shock proteins as a possible link between infection and atherosclerosis.** *Circulation* 1999, **99**:1560-6.
16. de Kruif MD, van Gorpa EC, Kellera TT, Ossewaardec JM, ten Cate H: **Chlamydia pneumoniae infections in mouse models: relevance for atherosclerosis research.** *Cardiovasc Res* 2005, **65**:317-27.
17. Laurila A, Bloigu A, N yh  S, Hassi J, Leinonen M, Saikku P: **Chronic Chlamydia pneumoniae infection is associated with a serum lipid profile known to be a risk factor for atherosclerosis.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997, **17**:2910-3.

18. Loomis WP, Starnbach MN: **T cell responses to Chlamydia trachomatis.** *Curr Opin Microbiol* 2002, **5**:87-91.
19. Goh BT, Forster GE: **Sexually transmitted diseases in children: chlamydial oculo-genital infection.** *Genitourin Med* 1993, **69**:213-21.
20. Kalman S, Mitchell W, Marathe R, Lammel CJ, Fan T, Hyman RW, et al: **Comparative genomes of Chlamydia pneumoniae and C. trachomatis.** *Nat Genet* 1999, **21**:385-9.
21. Yang ZP, Kuo CC, Grayston JT: **Systemic dissemination of Chlamydia pneumoniae following intranasal inoculation in mice.** *J Infect Dis* 1995, **171**:736-8.
22. Fryer RH, Schwobe EP, Woods ML, Rodgers GM: **Chlamydia species infect human vascular endothelial cells and induce procoagulant activity.** *J Investig Med* 1997, **45**:168-74.
23. Krull M, Kramp J, Klucken AC, Hocke AC, Walter C, Schmeck B, et al: **Differences in cell activation by Chlamydia pneumoniae and Chlamydia trachomatis infection in human endothelial cells.** *Infect Immun* 2004, **72**:6615-21.
24. Kilic T, Jneid H, Ural E, Oner G, Sahin T, Kozdag G, et al: **Impact of the metabolic syndrome on high-sensitivity C reactive protein levels in patients with acute coronary syndrome.** *Atherosclerosis* 2009, **207**:591-6.
25. Executive summary of the third report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (adult treatment panel III). *JAMA* 2001, **285**:2486-97.
26. Bas S, Muzzin P, Vischer TL: **Chlamydia trachomatis serology: diagnostic value of outer membrane protein 2 compared with that of other antigens.** *J Clin Microbiol* 2001, **39**:4082-5.
27. Mahony JB, Schachter J, Chernesky MA: **Detection of antichlamydial immunoglobulin G and M antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay.** *J Clin Microbiol* 1983, **18**:270-5.
28. Ellis R: **Infection and coronary heart disease.** *J Med Microbiol* 1997, **46**:535-9.
29. Siscovick D, Schwartz S, Corcy L, Grayston T, Ashley R, Wang S, et al: **Chlamydia pneumoniae, herpes simplex virus type 1, and cytomegalovirus and incident myocardial infarction and coronary heart disease death in older adults: The Cardiovascular Health Study.** *Circulation* 2000, **102**:2335-40.

30. Ervin RB: **Prevalence of metabolic syndrome among adults 20 years of age and over, by sex, age, race and ethnicity, and body mass index: United States, 2003-2006.** *Natl Health Stat Report* 2009, **5**:1-7.
31. Adegoke O, Adedoyin R, Adebayo R, Bisiriyu L, Salawu A: **Prevalence metabolic syndrome in a rural community in Nigeria.** *Metab Syndr Relat Disord*, in press.
32. Gupta R, Deedwania P, Gupta A, Rastogi S, Panwar R, Kothari K: **Prevalence of metabolic syndrome in an Indian urban population.** *Int J Cardiol* 2004, **97**:257-61.
33. Franco G, Scala L, Alves C, França G, Cassaneili T, Jardim P: **Metabolic syndrome in patients with high blood pressure in Cuiabá - Mato Grosso State: prevalence and associated factors.** *Arq Bras Cardiol* 2009, **92**:437-42.
34. den Hartog J, Land J, Stassen F, Kessels A, Bruggeman C: **Serological markers of persistent C. trachomatis infections in women with tubal factor subfertility.** *Hum Reprod* 2005, **20**:986-90.
35. Wilkowska-Trojnieł M, Zdrodowska-Stefanow B, Ostaszewska-Puchalska I, Zbucka M, Wołczyński S, Grygoruk C, et al: **Chlamydia trachomatis urogenital infection in women with infertility.** *Adv Med Sci* 2009, **54**:82-5.
36. Tuuminen T, Palomäki P, Paavonen J: **The use of serologic tests for the diagnosis of chlamydial infections.** *J Microbiol Methods* 2000, **42**:265-79.
37. Danesh J, Whincup P, Walke M, Lennon L, Thomson A, Appleby P, et al: **Chlamydia pneumoniae IgG titres and coronary heart disease: prospective study and meta-analysis.** *BMJ* 2000, **321**:208-13.
38. Kiechl S, Lgger G, Mayr M, Wiedermann C, Bonora E, Oberhollenzer F, et al: **Chronic infection and the risk of carotid atherosclerosis: prospective results from a large population study.** *Circulation* 2001, **103**:1064-70.
39. LaBiche R, Koziol D, Quinn T, Gaydos C, Azhar S, Ketron G, et al: **Presence of Chlamydia pneumoniae in human symptomatic and asymptomatic carotid atherosclerotic plaque.** *Stroke* 2001, **32**:855-60.
40. García-Elorriaga G, Calderón-Abbo M, González-Bonilla C: **Association between cardiovascular disease and anti-Chlamydia pneumoniae antibodies.** *Salud Publica Mex* 2002, **44**:243-6.
41. Pinar A, Oç M, Akyön Y, Farsak B, Koçyildirim E, Us D, et al: **The presence of Chlamydia pneumoniae, Helicobacter pylori and cytomegalovirus in human atherosclerosis detected by molecular and serological methods.** *Mikrobiyol Bul* 2004, **38**:213-22.

42. Kilic A, Onguru O, Tugcu H, Kilic S, Guney C, Bilge Y: **Detection of cytomegalovirus and Helicobacter pylori DNA in arterial walls with grade III atherosclerosis by PCR.** *Pol J Microbiol* 2006, **55**:333-7.
43. Lunardi C, Dolcino M, Peterlana D, Bason C, Navone R, Tamassia N, et al: **Endothelial cells activation and apoptosis induced by a subset of antibodies against human cytomegalovirus: relevance to the pathogenesis of atherosclerosis.** *PLoS One* 2007, **2**:e473.
44. Shi Y, Tokunaga O: **Herpesvirus (HSV-1, EBV and CMV) infections in atherosclerotic compared with non-atherosclerotic aortic tissue.** *Pathol Int* 2002, **52**:31-9.
45. Alber D, Powell K, Vallance P, Goodwin D, Grahame-Clarke C: **Herpesvirus infection accelerates atherosclerosis in the apolipoprotein E-deficient mouse.** *Circulation* 2000, **102**:779-85.
46. Kotronias D, Kapranos N: **Herpes simplex virus as a determinant risk factor for coronary artery atherosclerosis and myocardial infarction.** *In Vivo* 2005, **19**:351-7.
47. Alyan O, Kacmaz F, Ozdemir O, Deveci B, Astan R, Celebi A, et al: **Hepatitis C infection is associated with increased coronary artery atherosclerosis defined by modified Reardon severity score system.** *Circ J* 2008, **72**:1960-5.
48. Ishizaka N, Ishizaka Y, Takahashi E, Toda E, Hashimoto H, Ohuo M, et al: **Increased prevalence of carotid atherosclerosis in hepatitis B virus carriers.** *Circulation* 2002, **105**:1028-30.
49. Zhu J, Quyyumi AA, Norman J, Costello R, Csako G, Epstein S: **The possible, role of hepatitis A virus in the pathogenesis of atherosclerosis.** *J Infect Dis* 2000, **182**:1583-7.
50. Haider A, Wilson P, Larson M, Evans J, Michelson E, Wolf P, et al: **The association of seropositivity to Helicobacter pylori, Chlamydia pneumoniae, and cytomegalovirus with risk of cardiovascular disease: a prospective study.** *J Am Coll Cardiol* 2002, **40**:1408-13.
51. Tsai C, Kao J, Hus K, Chiang F, Tseng C, Liao C, et al: **Relation of Chlamydia pneumoniae infection in Taiwan to angiographically demonstrated coronary artery disease and to the presence of acute myocardial infarction or unstable angina pectoris.** *Am J Cardiol* 2001, **88**:960-3.
52. Köksal A, Ekmekçi Y, Karadeniz Y, Köklu S, Apan T, Yilmaz M, et al: **Helicobacter pylori seropositivity and atherosclerosis risk factors.** *Dig Dis* 2004, **22**:386-9.

53. Auer J, Leitinger M, Berent R, Prammer W, Weber T, Lassnig E, et al: **Hepatitis A IgG seropositivity and coronary atherosclerosis assessed by angiography.** *Int J Cardiol* 2003, **90**:175-9.
54. Caliskan Y, Oflaz H, Pusuroglu H, Boz H, Yazici H, Tamer S, et al: **Hepatitis C virus infection in hemodialysis patients is not associated with insulin resistance, inflammation and atherosclerosis.** *Clin Nephrol* 2009, **71**:147-57.
55. Yang K, Chen M, Su T, Jeng J, Hwang B, Lin L, et al: **Hepatitis B virus seropositivity is not associated with increased risk of carotid atherosclerosis in Taiwanese.** *Atherosclerosis* 2007, **195**:392-7.
56. Haberbosch W, Jantos C: **Chlamydia pneumoniae infection is not an independent risk factor for arterial disease.** *Herz* 2000, **25**:79-83.
57. Fan Y, Wang S, Yang X: **Chlamydia trachomatis (mouse pneumonitis strain) induces cardiovascular pathology following respiratory tract infection.** *Infect Immun* 1999, **67**:6145-51.
58. Hatch G, McClarty G: **C. trachomatis-infection accelerates metabolism of phosphatidylcholine derived from low density lipoprotein but does not affect phosphatidylcholine secretion from hepatocytes.** *BMC Microbiol* 2004, **4**:8.
59. Blessing E, Nagano S, Campbell L, Rosenfeld M, Kuo C: **Effect of Chlamydia trachomatis infection on atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice.** *Infect Immun* 2000, **68**:7195-7.
60. Mavrogeni SM, Spargias K, Kolovou G, Saroglu G, Cokkinos DV: **Myocardial involvement in a patient with Chlamydia trachomatis infection.** *J Card Fail* 2008, **14**:351-3.
61. Bachmaier K, Neu N, de la Maza L, Pal S, Hessel A, Penninger J: **Chlamydia infections and heart disease linked through antigenic mimicry.** *Science* 1999, **283**:1335-9.
62. Pfister G, Stroh CM, Perschinka H, Kind M, Knoflach M, Hinterdorfer P, et al: **Detection of HSP60 on the membrane surface of stressed human endothelial cells by atomic force and confocal microscopy.** *J Cell Sci* 2005, **118**:1587-94.
63. Kol A, Bourcier T, Lichtman A, Libby P: **Chlamydial and human heat shock protein 60s activate human vascular endothelium, smooth muscle cells, and macrophages.** *J Clin Invest* 1999, **103**:571-7.
64. Xu Q, Amberger A, Van der Zee R, Recheis H, Willeit J, Wick G, et al: **Autoantibodies against heat shock protein 60 mediate endothelial cytotoxicity.** *J Clin Invest* 1995, **96**:2569-77.

65. Mandal K, Foteinos G, Jahangiri M, Xu Q: **Role of anti heat shock protein 60 autoantibodies in atherosclerosis.** *Lupus* 2005, **14**:742-6.
66. Halme S, Syrjälä H, Bloigu A, Saikku P, Leinonen M, Airaksinen J, et al: **Lymphocyte responses to Chlamydia antigens in patients with coronary heart disease.** *Eur Heart J* 1997, **18**:1095-101.
67. Cappello F, Conway de Macario E, Di Felice V, Zummo G, Macario A: **Chlamydia trachomatis infection and anti-Hsp60 immunity: the two sides of the coin.** *PLoS Pathog*, in press.
68. Franck M, Staub H, Petracco J, Norman G, Lassen A, Schiavo N, et al: **Autoantibodies to the atheroma component beta2-glycoprotein I and risk of symptomatic peripheral artery disease.** *Angiology* 2007, **58**:295-302.
69. Staub H, Norman G, Crowther T, Cunha V, Polanczyk A, Bohn J, et al: **Antibodies to the atherosclerotic plaque components beta2-glycoprotein and heat shock proteins as risk factors for acute cerebral ischemia.** *Arq Neuropsiquiatr* 2003, **61**:757-63.
70. Lottermann A, Ranzolin A, von Muhlen C, Staub H: **Anticorpos contra proteína de choque térmico, autoimunidade e aterosclerose.** *Rev Bras Reumatol* 2003, **43**:302-8.
71. Gromadzka G, Zielinska J, Ryglewicz D, Fiszer A, Członkowska A: **Elevated levels of anti-heat shock protein antibodies in patients with cerebral ischemia.** *Cerebrovasc Dis* 2001, **12**:295-9.
72. Xu Q, Kiechl S, Mayr M, Metzler B, Egger G, Oberhollenzer F, et al: **Association of serum antibodies to heat-shock protein 65 with carotid atherosclerosis: clinical significance determined in a follow-up study.** *Circulation* 1999, **100**:1169-74.
73. Xu Q, Willeit J, Maroé M, Kleindienst R, Oberhollenzer F, Kiechl S, et al: **Association of serum antibodies to heat-shock protein 65 with carotid atherosclerosis.** *Lancet* 1993, **341**:255-9.
74. Bachmaier K, Penninger J: **Chlamydia and antigenic mimicry.** *Curr Top Microbiol Immunol* 2005, **296**:153-63.
75. Jha H, Prasad J, Mittal A: **High immunoglobulin A seropositivity for combined Chlamydia pneumoniae, Helicobacter pylori infection, and high- sensitivity C-reactive protein in coronary artery disease patients in India can serve as atherosclerotic marker.** *Heart Vessels* 2008, **23**:390-6.
76. Nishimura M, Hashimoto T, Kobayashi H, Fukuda T, Okino K, Yamamoto N, et al: **Close association of Chlamydia pneumoniae IgA seropositivity by ELISA with the**

presence of coronary artery stenosis in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2005, **20**:1944-50.

77. Stone A, Mendall M, Kaski JC, Edger TM, Risley P, Poloniecki J, et al: **Effect of treatment for Chlamydia pneumoniae and Helicobacter pylori on markers of inflammation and cardiac events in patients with acute coronary syndromes: South Thames Trial of Antibiotics in Myocardial Infarction and Unstable Angina (STAMINA).** *Circulation* 2002, **106**:1219-23.

78. Gurfinkel E, Bozovich G, Daroca A, Beck E, Mautner B: **Randomised trial of roxithromycin in non-Q-wave coronary syndromes: ROXIS Pilot Study. ROXIS Study Group.** *Lancet* 1997, **350**:404-7.

79. Jaff M, Dale R, Creager MA, Lipicky RJ, Constant J, Campbell LA, et al: **Anti-chlamydial antibiotic therapy for symptom improvement in peripheral artery disease: prospective evaluation of rifalazil effect on vascular symptoms of intermittent claudication and other endpoints in Chlamydia pneumoniae seropositive patients (PROVIDENCE-1).** *Circulation* 2009, **119**:452-8.

TABLES

Table 1. Demographic data of the sample.

	Total (n=238)	Women (n=172)	Mean Age			
	N	N	P*	Years	± SD	P**
METSwoE	101 (42.5%)	78 (78.2%)	0.34	58.9	9.9	0.64
METSweE	47 (19.7%)	28 (59.6%)	0.13	61.6	8.5	0.36
Controls	90 (37.8%)	65 (72.2%)		59.6	10.6	

n/N: sample number; SD: standard deviation; METSwoE: METS without cardiac events; METSweE: METS with cardiac event; *Chi-square test, compared to controls; **Student t test, compared to controls.

Table 2. Association between anti-CT IgA and IgG and METS.

	With METS (n=148)	Controls (n=90)	OR*	CI95%	P**
Anti-CT IgA	17.0%	6.0%	3.4	1.2-9.4	0.015
Anti-CT IgG	4.1%	2.2%	1.8	0.4-9.5	0.45

CT: *Chlamydia trachomatis*; METS: metabolic syndrome, n: absolute number; OR*: odds ratio adjusted for sex and age; CI95%: 95% confidence interval; **Chi-square test.

Table 3. Prevalence of anti-CT IGA and IgG antibodies in individuals with METS (with and without cardiac events) and controls.

	METS woE (n=101)	Controls (n=90)	P*	METS weE (n=47)	Controls (n=90)	P*	METS woE (n=101)	METS weE (n=47)	P*
Anti-CT IgA	18%	6%	0.013	15%	6%	0.11	18%	15%	0.81
Anti-CT IgG	3%	2.2%	0.99	6.4%	2.2%	0.34	3%	6.4%	0.39

CT: *Chlamydia trachomatis*; METS: metabolic syndrome; METSwoE: METS without cardiac events, METSweE: METS with cardiovascular events; * Chi-square test.


Table 4. Odds ratios adjusted for anti-CT IgA and IgG in the different groups.

	OR*	CI95%	P
Anti-CT IgA: METSwoE x controls	3.6	1.32-10.2	0.015
Anti-CT IgG : METSwoE x controls	1.2	0.2-7.5	0.82
Anti-CT IgA : METSwe x controls	3.1	0.9-10.9	0.06
Anti-CT IgG: METSwe x controls	3.6	0.5-22.0	0.17
Anti-CT IgA : METSwe x METSwoE	1.2	0.05-1.7	0.19
Anti-CT IgG : METSwe x METSwoE	0.32	0.45-3.2	0.69

CT: *Chlamydia trachomatis*; OR adjusted for sex and age in a logistic regression model. CI95% 95% confidence interval; METSwoE: METS without cardiovascular events; METSwe: METS with cardiovascular events.

ANEXO D - Comprovantes de submissão do artigo ao journal of biomedical science





**JOURNAL OF
BIOMEDICAL SCIENCE**

IMPACT
FACTOR
2.01

Welcome Luciele Schnem (Log off)

[BioMed Central home](#) | [Journals A-Z](#) | [Feedback](#) | [Support](#) | [My details](#)

[Home](#) | [Browse articles](#) | [Search](#) | [Weblinks](#) | [Submit article](#) | [My Journal of Biomedical Science](#) | [About Journal of Biomedical Science](#)

[checklist](#)
[contact details](#)
[manuscript details](#)
[cover letter](#)
[author details](#)
[upload](#)
[done](#)

Antibodies to Chlamydia tracho... (Manuscript ID 1448725291348185)

Congratulations - you have successfully submitted your manuscript to *Journal of Biomedical Science*

You will shortly receive a confirmatory e-mail. At any time, you may log in to [My Manuscripts](#) to view the status of your manuscript in peer review. You may also submit revisions of your manuscript via [My Manuscripts](#).

Thank you for submitting your research to *Journal of Biomedical Science*. To help us understand what is important to our authors, please take a minute to complete our short [online questionnaire](#) (opens in a new window).

If you have any questions, please e-mail info@biomedcentral.com.

[Cure Alzheimer Fund](#)
Learn more about AD and how to support find a cure.
www.CureAlzFund.org/Donate

[Full-Text Online Library](#)
Use the World's Largest Online Library for Your Graduate Research!
www.Questia.com

[Cancer Treatment in USA](#)
Radiation Therapy, Chemotherapy, Biotherapy, VIP Travel & Treatment
www.ExecutiveHealthPassport.com

[Antimicrobial remedy](#)
Silver nanoparticles are effective Kills most viruses and bacteria
www.biophysica.com

1448725291348185 Antibodies to Chlamydia trachomatis and metabolic syndrome

Journal of Biomedical Science Editorial [editorial@jbiomedsci.com]

Para: [Prof Luciele Sehnem](#)

Cc: [Prof Luciele Sehnem](#); [Luciele Sehnem](#); [Luiz C Bodanese](#); [Giuseppe Repetto](#); [Henrique L Staub](#)

Article title: Antibodies to Chlamydia trachomatis and metabolic syndrome

MS ID : 1448725291348185

Authors : Luciele Sehnem, Luiz C Bodanese, Giuseppe Repetto and Henrique L Staub

Journal : Journal of Biomedical Science

Dear Prof Sehnem

Thank you for submitting your article. This acknowledgement and any queries below are for the contact author. This e-mail has also been copied to each author on the paper, as well as the person submitting. Please bear in mind that all queries regarding the paper should be made through the contact author.

A pdf file has been generated from your submitted manuscript and figures. We would be most grateful if you could check this file and let us know if any aspect is missing or incorrect. Any additional files you uploaded will also be sent in their original format for review.

http://www.jbiomedsci.com/imedia/1448725291348185_article.pdf (131K)

For your records, please find below link(s) to the correspondence you uploaded with this submission.

http://www.jbiomedsci.com/imedia/1125376360348188_comment.pdf

We will assign peer reviewers as soon as possible, and will aim to contact you with an initial decision on the manuscript within six weeks.

In the meantime, if you have any queries about the manuscript you may contact us on editorial@jbiomedsci.com. We would also welcome feedback about the online submission process, which can be sent to info@biomedcentral.com.

Best wishes,

The Journal of Biomedical Science Editorial Team

e-mail: editorial@jbiomedsci.com

Web: <http://www.jbiomedsci.com/>