



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE:  
CARDIOLOGIA E CIÊNCIAS CARDIOVASCULARES**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Estudo da Associação de Níveis Séricos e Polimorfismos Genéticos de  
Metaloproteinases de Matriz com Aspectos Clínicos, Radiológicos e  
Histológicos da Placa Aterosclerótica Carotídea**

**Autora: Daiane Silvello**

**Orientador: Prof. Dr. Luis Eduardo Rohde  
Co-orientadora: Profa. Dra. Kátia Gonçalves dos Santos**

**Porto Alegre, agosto de 2011.**

**Estudo da Associação de Níveis Séricos e Polimorfismos Genéticos de  
Metaloproteinases de Matriz com Aspectos Clínicos, Radiológicos e  
Histológicos da Placa Aterosclerótica Carotídea**

AUTORA: Daiane Silvello

Dissertação para  
obtenção do título de Mestre  
apresentada à Universidade  
Federal do Rio Grande do Sul,  
Faculdade de Medicina,  
Programa de Pós-Graduação em  
Ciências da Saúde: Cardiologia  
e Ciências Cardiovasculares.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Luis Eduardo Rohde  
CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. Kátia Gonçalves dos Santos

Porto Alegre, 2011

## CIP - Catalogação na Publicação

Silvello, Daiane Nicoli

Estudo da Associação de Níveis Séricos e Polimorfismos Genéticos de Metaloproteinases de Matriz com Aspectos Clínicos, Radiológicos e Histológicos da Placa Aterosclerótica Carotídea / Daiane Nicoli Silvello. -- 2011.

88 f.

Orientador: Luis Eduardo Paim Rohde.

Coorientador: Kátia Gonçalves dos Santos.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Cardiologia e Ciências Cardiovasculares, Porto Alegre, BR-RS, 2011.

1. Aterosclerose . 2. Metaloproteinases de matriz. 3. Placa carotídea. I. Paim Rohde, Luis Eduardo, orient. II. Gonçalves dos Santos, Kátia, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Pesquisa Cardiovascular do Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e no Serviço de Cirurgia Cardiovascular do Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, com o auxílio financeiro do CNPq e FIPE-HCPA.

## **AGRADECIMENTOS**

À Dra. Luciane Narvaes, pela realização das cirurgias de endarterectomia, disponibilizando o material necessário para o desenvolvimento deste trabalho.

À Profa. Dra. Luise Meurer, pela fundamental contribuição para a análise histológica das placas de ateroma.

Ao biólogo Luiz Felipe Forgiarini, pela importante colaboração na análise das lâminas histológicas, fundamental etapa deste estudo.

Aos pacientes que colaboraram neste estudo.

À Deus e “colaboradores”, pela fé que dediquei durante os momentos de dúvida e desânimo.

Aos meus pais, pelo carinho e amor que dedicarão durante minha educação, sentimentos que carrego comigo por todas as etapas da vida. Pelo suporte e compreensão durante a realização deste longo projeto.

Aos meus irmãos e cunhada, por tolerarem meu estresse e mau humor, emoções que só poderia descarregar neles, pois sei que estarão sempre ao meu lado, independente do que eu esteja passando.

Às minhas sobrinhas Eduarda, Anna Luiza e Valentina, por mesmo sem saber, sofrerem a minha ausência. Meninas, eu não pude acompanhar muito vocês durante a realização do meu mestrado, mas quero deixar registrado aqui que por diversas vezes vocês foram minha válvula de escape, me proporcionando excelentes momentos de alegria.

Aos meus colegas Rafael Dall' Alba, Estefanie Schineider e Michael Andrades pela amizade, carinho e pelos bons momentos que passamos juntos dividindo a bancada ou uma pequena mesa de escritório.

Às minhas amigas Carolina Cohen e Nidiane Martinelli pelo companheirismo e amparo, principalmente nas fazes mais difíceis que passei. Meninas vocês não só simplesmente me tiraram do buraco, mas entraram nele comigo, para sairmos juntas e de mãos dadas. Obrigada queridas por participarem da minha vida.

À minha co-orientadora Prof. Dra. Kátia Gonçalves dos Santos pelo incentivo, apoio e dedicação, pelos ensinamentos que vão muito além da pesquisa, pela compreensão nos momentos de dificuldade e acima de tudo pelo carinho e amizade.

Ao meu orientador Prof. Dr. Luiz Eduardo Rohde, pela oportunidade, pelo conhecimento transmitido, pela compreensão e principalmente por acreditar em mim até mesmo quando eu não acreditava. Rohde, agradeço a ti por ter me

tornado a pesquisadora que sou hoje, pois sem teu apoio eu teria travado nas principais etapas do processo evolutivo de um pesquisador.

Ao meu amor, Marcos Thomé, por estar ao meu lado e apoiar todas as minhas decisões sem cobranças ou garantias. Agradeço por ser um marido dedicado, companheiro, meu amigo de todas as horas. Obrigada Mimo por existir e fazer parte da minha vida.

Ao meu filho Pietro, que chegou de surpresa, durante o mestrado, trazendo com ele sentimentos de dúvida, medo e insegurança. Mas me fez ver que sou capaz de realizar muitas coisas, as quais eu julgava incompetente, incluindo a conclusão deste projeto. Pietro você com certeza é o meu maior e melhor experimento.

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>5</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>9</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>10</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>11</b>
<b>1 MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>12</b>
1.1 EPIDEMIOLOGIA.....	12
1.2 DOENÇA OCLUSIVA DE CARÓTIDAS.....	12
1.3 OPÇÕES TERAPÊUTICAS .....	14
1.4 VULNERABILIDADE DA PLACA ATEROSCLERÓTICA CAROTÍDEA .....	15
1.5 HEMORRAGIA INTRAPLACA .....	17
1.6 ATEROSCLEROSE E INFLAMAÇÃO.....	19
1.7 METALOPROTEINASES DE MATRIZ .....	23
1.8 METALOPROTEINASES DE MATRIZ E DOENÇA ATEROSCLERÓTICA CAROTÍDEA.....	24
1.9 METALOPROTEINASES DE MATRIZ E VULNERABILIDADE DA PLACA ATEROSCLERÓTICA .....	25
1.10 POLIMORFISMOS GENÉTICOS DAS MMPs E DOENÇA ATEROSCLERÓTICA .....	29
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>31</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>33</b>
<b>4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>36</b>
<b>5 ARTIGO ORIGINAL</b> .....	<b>50</b>
5.1 ABSTRACT .....	51
5.2 INTRODUCTION .....	52
5.3 METHODS .....	54
5.4 RESULTS .....	60
5.5. DISCUSSION .....	63
5.6. REFERENCES .....	67
<b>6 ANEXOS</b> .....	<b>82</b>
6.1 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	82
6.2 FICHA DE AVALIAÇÃO CLÍNICA .....	84
6.3 FICHA DE AVALIAÇÃO NEUROLÓGICA .....	85
6.4 FICHA LABORATORIAL .....	86
6.5 FICHA ANGIOGRÁFICA.....	87
6.6 FICHA HISTOLÓGICA .....	88



## LISTA DE ABREVIATURAS

### MARCO TEÓRICO

AIT – Ataque isquêmico transitório

AVE – Ataque vascular encefálico

DVP – Doença vascular periférica

EC – Endarterectomia carotídea

HIP – Hemorragia intraplaca

IAM – Infarto agudo do miocárdio

MMP – Metaloproteinase de matriz

PCR – Proteína C reativa

PTX-3 – Pentraxina-3

RNM – Ressonância nuclear magnética

TIMP – Inibidor tissular das metaloproteinases de matriz

### ARTIGO ORIGINAL

FCT – Fibrous cap thickness

hs- CRP –C reactive protein high sensible

IPH – Intraplaque hemorrhage

MMP – Matrix metalloproteinase

MRI – Magnetic resonance imaging

PTX-3 – Pentraxin-3

TIA – Transient ischemic attack

**LISTA DE TABELAS****ARTIGO ORIGINAL**

<b>Table 1</b>	Clinical characteristics of the studied population.....	70
<b>Table 2</b>	Clinical characteristics according to MMPs genotypes .....	71
<b>Table 3</b>	Serum levels of MMPs and inflammatory markers of plaque vulnerability according to MMPs genotypes.....	72
<b>Table 4</b>	Histological analysis and MMPs genotypes.....	73
<b>Supplementary Table</b>	Demographic, clinical and genetic characteristics of patients who were studied in histology.....	74

## LISTA DE FIGURAS

### MARCO TEÓRICO

- Figura 1** Patogênese da placa aterosclerótica.....13
- Figura 2** Exemplos de hemorragia intraplaca na lesão aterosclerótica.....15
- Figura 3** Aumento regional da expressão de metaloproteinases de matriz nas placas ateroscleróticas.....24

### ARTIGO ORIGINAL

- Figura 1** Representative image of methods using histopathologic analyses .....75
- Figura 2** Genotype frequencies of MMPs gene polymorphisms in study patients.....76
- Figura 3** Correlations of MMP-9 serum levels with inflammatory markers.....77
- Figura 4** MMP-9 serum levels and clinical and histological markers of atherosclerosis vulnerability.....77

## **1 MARCO TEÓRICO**

### **1.1 Epidemiologia**

A doença aterosclerótica cerebrovascular representa atualmente uma prioridade em saúde pública nos países desenvolvidos e no Brasil. Devido a sua alta prevalência, constitui-se na segunda maior causa de morte e principal causa de incapacitação na população adulta mundial (1-3). Cerca de 0,2% da população ocidental (2.000/1.000.000) é acometida por ataque vascular encefálico (AVE) a cada ano, com uma taxa de mortalidade de 30% no primeiro ano e evolução com seqüelas maiores e incapacitação em outros 30%, ocorrendo recuperação da capacidade produtiva nos casos restantes (4). Nos EUA, ocorrem mais de 700.000 casos novos ou recorrentes de AVE anualmente, e destes, 160.000 são fatais (5).

Aproximadamente 80% de todos os AVEs são de origem isquêmica, sendo que 60% destes são atribuídos à doença aterotrombótica extracraniana. A aterosclerose carotídea, na maioria dos casos atingindo a bifurcação, é responsável por 20% de todos os AVEs pelos mecanismos de trombose ou embolização, e representa um importante alvo para a prevenção primária e secundária (5-7).

### **1.2 Doença oclusiva de carótidas**

Na aterosclerose carotídea, os sintomas geralmente estão associados à ocorrência de macro ou microembolizações relacionadas à placa

aterotrombótica localizada na bifurcação, resultando na isquemia do território cerebral acometido (8). As manifestações da isquemia cerebral dependerão do território vascular comprometido por meio dos mecanismos compensatórios relacionados ao estado hemodinâmico geral do paciente e dos ramos colaterais a partir do polígono de *Willis* (9, 10).

As manifestações da insuficiência vascular cerebral apresentam formas diversas e quadros clínicos que variam desde ligeiros distúrbios visuais e sensação de perda de sensibilidade até quadros neurológicos graves com seqüelas motoras definitivas e morte. Caracteristicamente, os fenômenos tromboembólicos provenientes da bifurcação carotídea causam déficit hemisférico focal, manifestando-se por amaurose ipsilateral, hemiparesia ou hemiplegia contralateral, de predomínio braquial, ou por dificuldades de expressão, como afasia, disfasia ou disartria, quando é acometido o hemisfério cerebral dominante. Sintomas como tonturas, vertigem, alterações posturais ou síncope são mais raros e, geralmente, sugerem comprometimento concomitante do território vértebro-basilar (9, 10). Assim, dentro do espectro clínico da doença cerebrovascular, pode-se ter desde queixas como dormência leve e recidivante da mão até um quadro de hemiplegia súbita e irreversível (11).

Classicamente, a nomenclatura das síndromes isquêmicas cerebrais leva em consideração a reversibilidade e o tempo de evolução do déficit neurológico. Quando o quadro de isquemia cerebral apresenta reversão completa em até 24 horas, sem deixar seqüelas, denomina-se ataque isquêmico transitório (AIT), o qual apresenta risco de 30% de recorrência ou evolução para o AVE. Entretanto, se o déficit neurológico permanece por mais

de 24 horas, caracterizando o infarto cerebral, denomina-se AVE, independentemente da recuperação futura ou do grau de seqüela neurológica. Além disso, tal distinção é reconhecidamente arbitrária, visto que danos teciduais permanentes são encontrados em até 25% dos pacientes com AIT (9-11).

### **1.3 Opções terapêuticas**

A endarterectomia carotídea (EC) é uma cirurgia profilática que tem como objetivo evitar a ocorrência de lesões isquêmicas cerebrais em pacientes com doença obstrutiva de artérias carótidas. Diversos ensaios clínicos, baseados principalmente no percentual de estenose, estabeleceram critérios de indicação cirúrgica e demonstraram que a EC diminui a incidência de AVE e morte em pacientes sintomáticos ou assintomáticos (9,12-15).

Nos pacientes sintomáticos, a realização da EC visa impedir a evolução para o AVE nos pacientes com AIT, ou salvar o parênquima cerebral sob risco de novo infarto e restaurar a qualidade de vida, nos casos de AVE já constituído. Nesses casos, o benefício da EC foi claramente estabelecido por dois ensaios clínicos, o *North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial (NASCET)* e o *European Carotid Surgery Trial (ECST)* (16, 17).

Na doença obstrutiva assintomática de carótidas é difícil determinar com precisão o número de AVEs que podem ser evitados pela EC na população geral. Por isso, apesar de existirem evidências que suportam a indicação de EC nos indivíduos assintomáticos, são dados menos robustos em comparação aos estabelecidos para os casos sintomáticos. Os principais ensaios clínicos

demonstrando os benefícios da EC em pacientes assintomáticos são o *Asymptomatic Carotid Atherosclerosis Study (ACAS)* e o *Asymptomatic Carotid Surgery Trial (ACST)* (18, 19).

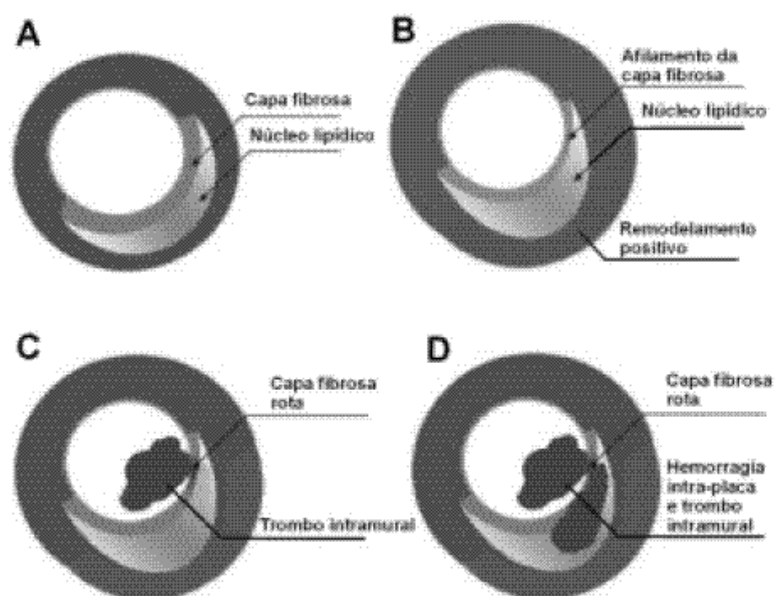
Em síntese, os diversos ensaios clínicos que testaram a eficácia da EC na prevenção primária e secundária de novos eventos cerebrovasculares demonstraram benefício clínico evidente, porém de magnitude variável, de acordo com a presença dos sintomas prévios e a gravidade da doença oclusiva carotídea. Todos os estudos, entretanto, utilizaram o grau de estenose vascular (<70%, 70-90%, >90%) como parâmetro principal de inclusão e estratificação nas análises (16-19). Este aspecto vem sendo questionado por diversos investigadores à luz da evolução do conhecimento das características associadas à vulnerabilidade das placas ateroscleróticas, como será visto a seguir.

#### **1.4 Vulnerabilidade da placa aterosclerótica carotídea**

A vulnerabilidade da placa de ateroma, manifestada como ulceração da capa fibrosa, ruptura da placa, ou hemorragia intraplaca, é responsável pela maioria das complicações da aterosclerose (20). Embora na atualidade a decisão terapêutica na doença carotídea seja definida pelo percentual de estenose, os eventos cerebrovasculares são determinados pela vulnerabilidade das placas (21-23), com fortes evidências sugerindo que os sintomas clínicos e a morbidade resultante da doença estão relacionados à sua instabilidade (24-29).

A placa carotídea vulnerável é aquela que apresenta uma elevada tendência a causar eventos isquêmicos relacionados à embolização ou ruptura. Análises histológicas de espécimes de ECs sugerem que as placas de alto risco apresentam um grande núcleo necrótico rico em lipídios, capa fibrosa fina com tendência à ruptura, infiltrado inflamatório intenso, presença de neovascularização e hemorragia intraplaca. Assim, a vulnerabilidade é ditada, em parte, pela morfologia da placa que, por sua vez, é influenciada por mecanismos fisiopatológicos no nível celular e molecular (20, 22, 23).

O conceito de vulnerabilidade da placa aterosclerótica foi inicialmente introduzido nos estudos utilizando como referência a doença obstrutiva coronariana, tanto em nível experimental como clínico (21, 30-33), consolidando o consenso vigente de que, independentemente do grau de estenose, as lesões vulneráveis são caracterizadas pela morfologia da placa aterosclerótica (34) (Figura 1).



**Figura 1. Patogênese da placa aterosclerótica: A) Lesão inicial; B) Remodelamento positivo e afinamento da capa fibrosa; C) Ruptura da capa fibrosa sem hemorragia intraplaca; D) Hemorragia intraplaca determinando a ruptura da capa fibrosa. Adaptado de Rohde e Lee (34).**



Os ensaios clínicos também comprovam que a obstrução luminal é limitada para determinar a ocorrência de eventos clínicos e a história natural da doença carotídea. O grau de estenose permite prever 1 entre 4 AVEs nos pacientes sintomáticos e somente 1 entre 10 AVEs nos pacientes assintomáticos. Então, outras propriedades da placa, além do grau de obstrução isoladamente, são importantes para identificar os pacientes com risco de AVE (14, 17, 18, 35).

Neste contexto, o reconhecimento precoce das características de instabilidade da placa pode identificar um grupo de pacientes com potencial para complicações trombóticas que possivelmente poderia se beneficiar de intervenções mais agressivas ou precoces (36-39).

### **1.5 Hemorragia intraplaca**

A alta prevalência de hemorragia intraplaca (HIP) nas lesões ateroscleróticas avançadas, comprovada por estudos de análise histológica, levanta a intrigante possibilidade de ser este o principal mecanismo da progressão da placa aterosclerótica carotídea (36) (Figura 2). Recentemente, avanços nos métodos de imagem permitiram avaliar, de forma não-invasiva e seqüencial, diversos aspectos da placa aterosclerótica carotídea e, em especial, a presença de HIP. Já é reconhecido que a ressonância nuclear magnética (RNM) de alta resolução *in vivo* pode identificar e estagiar a HIP em placas carotídeas avançadas com alta sensibilidade e especificidade moderada (40). O sangramento dentro da parede do vaso pode estimular a progressão do processo aterosclerótico, pelo aumento do núcleo lipídico e consequente

aumento do volume da placa, e também pelo estímulo de novos fatores desestabilizadores (41).

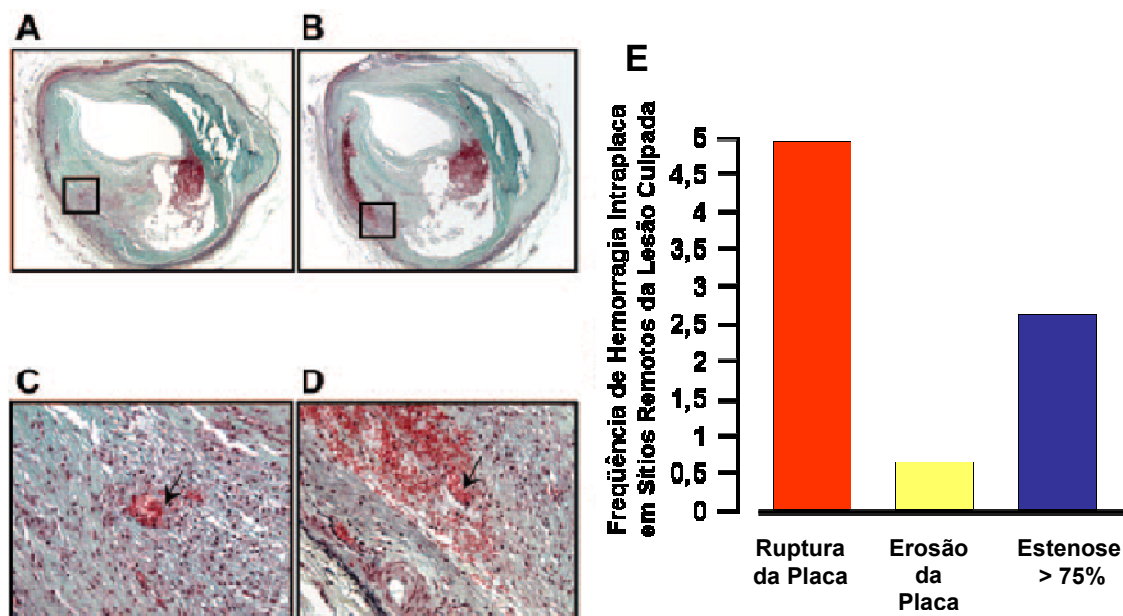


Figura 2. Exemplos de hemorragia intraplaca na mesma lesão aterosclerótica (A e B) e em ampliados (C e D). Frequência de HIP em locais remotos da lesão culpada (E). Adaptado de Virmani et al. (36).

Em um estudo prospectivo envolvendo 29 indivíduos (14 casos com HIP e 15 controles sem HIP), acompanhados por 18 meses com RNM, Takaya e cols. (42) observaram que a HIP acelera a progressão da placa aterosclerótica carotídea. Os pesquisadores do mesmo grupo, em um estudo envolvendo 154 pacientes consecutivos com estenose carotídea assintomática de 50 a 70%, diagnosticada por ultrassonografia, indicaram que a HIP identificada por RNM pode prever eventos cerebrais isquêmicos, como AIT, AVE ou amaurose fugaz (43). Além disso, outro estudo demonstrou que a HIP detectada por RNM pode prever eventos cerebrovasculares recorrentes em pacientes com estenose carotídea grave (60% a 99%) (44).

Do mesmo modo, em um estudo desenvolvido pelo nosso grupo, Albuquerque e cols. (45) demonstraram em 70 pacientes consecutivos submetidos à endarterectomia carotídea, que a HIP evidenciada pela presença de sinal hiperintenso na RNM de alta resolução está associada com a instabilidade de sintomas neurológicos e o aumento nos níveis de marcadores inflamatórios sistêmicos. Tais achados não se correlacionaram com o grau de estenose angiográfico ou com a espessura da capa fibrosa, concordando com o conceito de que o grau de estenose luminal no sistema carotídeo, de modo semelhante ao que ocorre na doença coronariana, não é um marcador adequado de vulnerabilidade do ateroma (42-45).

Neste cenário, a HIP emerge como um aspecto central nos eventos que levam à instabilidade da placa aterosclerótica, particularmente na circulação extracraniana. Estudos recentes sugerem que a HIP pode representar um potente estímulo aterogênico, contribuindo para a infiltração de macrófagos e para o crescimento do núcleo necrosado da placa aterosclerótica (46). Adicionalmente, alterações estruturais na hemoglobina livre extra-eritrocitária, podem originar um sinal danoso ao sistema imune e, assim, contribuir para o processo inflamatório que acontece dentro do ateroma (47).

## **1.6 Aterosclerose e inflamação**

A aterosclerose foi originalmente considerada um distúrbio decorrente da deposição progressiva de lipoproteínas do colesterol nas paredes dos vasos, e há três décadas conceituada como um processo proliferativo brando (48). Com a evolução da ciência e o desenvolvimento da tecnologia tornou-se possível o

estudo de moléculas específicas na formação do ateroma, demonstrando o papel crítico da hipercolesterolemia e também evidenciando a importante participação do sistema imune na patogênese da aterosclerose (49).

Atualmente a aterosclerose é descrita como uma doença inflamatória crônica multifatorial do sistema arterial (48). A descoberta do envolvimento de vários mecanismos inflamatórios na doença aterosclerótica tem contribuído para a modificação de alguns paradigmas etiopatogênicos que restringiam a causa da doença unicamente ao acúmulo progressivo de lipídios na parede arterial. O reconhecimento da natureza inflamatória no desenvolvimento da doença é clinicamente relevante visto que somente 50% dos pacientes com aterosclerose apresentam dislipidemia (50). Além disso, pacientes com irregularidade angiográfica carotídea bilateral apresentam uma taxa maior de infarto agudo do miocárdio (IAM) prévio e morte súbita, possivelmente devido a um comportamento sistêmico na gênese dos fenômenos aterotrombóticos mais agressivos (51).

No modelo atual de aterogênese, a alteração da homeostase do endotélio, a partir de agressores locais ou sistêmicos, tais como o acúmulo de lipoproteínas, estresse mecânico (hipertensão arterial, intervenções percutâneas), toxinas do fumo ou substâncias oxidantes, agentes infecciosos, variações genéticas, doenças autoimunes, entre outros, constitui o evento inicial da formação e progressão da placa aterosclerótica (52). A lesão endotelial desencadeia uma série de respostas, caracterizadas por alterações da sua funcionalidade, através de modificações na sua aderência, permeabilidade, capacidade proliferativa e trombogênese (53, 54).

A disfunção endotelial promove a produção de moléculas de adesão, integrinas e selectinas, ocasionando o recrutamento e a agregação de monócitos, macrófagos, linfócitos e plaquetas na parede vascular, que acarretam a alteração da permeabilidade do endotélio. Estes elementos celulares ativados promovem a liberação de agentes pró-inflamatórios, sobretudo citocinas, interleucinas, interferon- $\alpha$ , fator quimiostático de monócitos, CD40 ligante, metaloproteinases de matriz extracelular, entre outros. Se o processo de agressão não é bloqueado, tais agentes continuam a ser produzidos indefinidamente, adquirindo alcance sistêmico, com liberação adicional de citocinas, agregação de partículas de LDL oxidado na superfície endotelial, produção e liberação hepática de substâncias inflamatórias, como a proteína C reativa (PCR), e ativação do sistema do complemento e da cascata inflamatória sistêmica (53, 54).

Simultaneamente, esta resposta inflamatória induz a deposição subendotelial de partículas de LDL oxidado que são sequestradas, modificadas e fagocitadas por macrófagos, originando as células espumosas (*foam cells*). Estas, juntamente com subtipos específicos de linfócitos T, por meio de mediadores químicos, promovem a migração e proliferação de células musculares lisas para a porção subendotelial, o que caracteriza histologicamente a lesão precoce (53-55).

A manutenção do estímulo pró-inflamatório leva à fase proliferativa, com a produção intensa de outras interleucinas, fator de necrose tumoral- $\alpha$ , fator de crescimento plaquetário e fator de crescimento fibroblástico. Em um primeiro momento ocorre um aumento acentuado na síntese de colágeno, a partir da ativação dos fibroblastos, formando a capa fibrosa (53-55). Nesta fase, o

crescimento intraparietal da área de inflamação ocorre no sentido oposto à luz da artéria, excentricamente, em direção à adventícia, num fenômeno denominado remodelamento positivo, com estímulo constante da liberação de enzimas proteolíticas da matriz intersticial e de citocinas, o que pode induzir à necrose focal. Assim, a lesão precoce transforma-se na placa madura, que apresenta crescimento excêntrico e remodelamento positivo (56).

O crescimento da placa de ateroma compromete, progressivamente, a propriedade anticoagulante das células endoteliais, originando um estado pró-trombogênico, para o qual contribuem diversos fatores, como a própria atividade inflamatória local, a ativação plaquetária, as alterações no metabolismo do óxido nítrico, o aumento da fosfodiesterase A<sub>2</sub>, a liberação de agentes vasoconstritores (tromboxanes, leucotrienos, serotonina, endotelina-1 e angiotensina-2) e, principalmente, a ativação das metaloproteinases de matriz (53-55, 57).

Dessa forma, o ciclo formado pelo acúmulo de células mononucleares, migração de células musculares lisas, e formação de tecido fibroso leva ao crescimento progressivo e a permanente reestruturação dinâmica da placa aterosclerótica, originando a capa fibrosa, que é capaz de isolar este material lipídico (por vezes necrótico) do contato direto com o sangue. Como já descrito, quanto mais tênue e suscetível à ruptura é a capa fibrosa, mais próximo estará o desfecho clínico relacionado à instabilização da placa (angina instável, IAM, AIT, AVE), cuja ocorrência é estimada em 50% dos casos de eventos agudos (56).

Além disso, as metaloproteinases de matriz promovem a degradação do colágeno e, nas placas ateroscleróticas avançadas, estão associadas à

hemorragia intraplaca, ruptura da capa fibrosa, trombose, embolização e oclusão. Dependendo do leito vascular envolvido, estes eventos podem trazer conseqüências agudas e catastróficas que incluem os quadros de síndrome coronariana aguda, síndromes isquêmicas viscerais ou de extremidades e, quando comprometem a circulação extra- e intracraniana, podem culminar na isquemia cerebral (53).

### **1.7 Metaloproteinases de matriz**

As metaloproteinases de matriz (MMPs) formam uma família de aproximadamente 30 enzimas proteolíticas zinco-dependentes capazes de degradar diferentes componentes da matriz extracelular, como colágeno, elastina e proteoglicanos (58). As MMPs atuam em diversos processos fisiológicos, como o desenvolvimento embrionário, crescimento tecidual e morfogênese (59). Estas proteases são identificadas e classificadas de acordo com o substrato específico em que atuam, e incluem, entre outras, as collagenases intersticiais como a MMP-1, estromelinas como a MMP-3 e gelatinases como a MMP-9 (47).

A MMP-1 cliva o colágeno tipo I, II e III da matriz extracelular, podendo atuar também sobre outros componentes da matriz, bem como sobre outras moléculas. A MMP-3, secretada por macrófagos, cliva diversos tipos de substratos como proteoglicanos, colágenos tipo IV e IX, fibronectina e laminina e, ainda, pode ativar a MMP-1. Já a MMP-9 tem a capacidade de degradar colágenos tipo I, III, IV e V, gelatinas, proteoglicanos e elastina (59).

A atividade das MMPs pode ser regulada em múltiplos níveis, tais como: transcrição, ativação de precursores zimogênicos, interação com outros componentes específicos da matriz extracelular e inibição pelos inibidores endógenos tissulares das MMPs (TIMPs) (60). Alterações em qualquer um desses mecanismos podem levar a modificações na expressão ou atividade das MMPs, o que vêm sendo demonstrado em diferentes condições patológicas, como nos processos inflamatórios, artrite, metástase tumoral, doenças respiratórias, aneurisma vascular, remodelamento e doenças cardiovasculares (60, 61).

Sendo assim, diversos estudos buscam elucidar o papel destas enzimas como mediadoras da doença arterial. Os trabalhos demonstram que alterações na funcionalidade das MMPs podem estar relacionadas aos diferentes estágios da aterosclerose, incluindo os processos de formação, progressão, complicação das placas ateroscleróticas e trombose (62).

### **1.8 Metaloproteinases de matriz e doença aterosclerótica carotídea**

A ação das MMPs na ocorrência de eventos isquêmicos cerebrovasculares vem recebendo atenção crescente. Alvarez e cols. (63) demonstraram uma associação entre níveis séricos elevados de MMP-9 e placas instáveis em pacientes com eventos neurológicos prévios, e uma correlação positiva entre os níveis desta gelatinase e a presença de macrófagos em espécimes de EC. Verhoeven e cols. (64) analisaram a relação entre os componentes celulares, sintomas e níveis de atividade tissular da



MMP-8 e -9 em 404 pacientes submetidos à cirurgia carotídea, onde observaram que nos casos com AIT ou AVE recentes, os níveis de atividade das MMPs foram significativamente maiores do que os encontrados nos pacientes assintomáticos. Um estudo piloto que analisou marcadores inflamatórios, por imunohistoquímica, identificou um aumento nos níveis de MMP-9, células T e macrófagos nos pacientes com isquemia cerebral tromboembólica comparados aos pacientes com isquemia cerebral hemodinâmica (65).

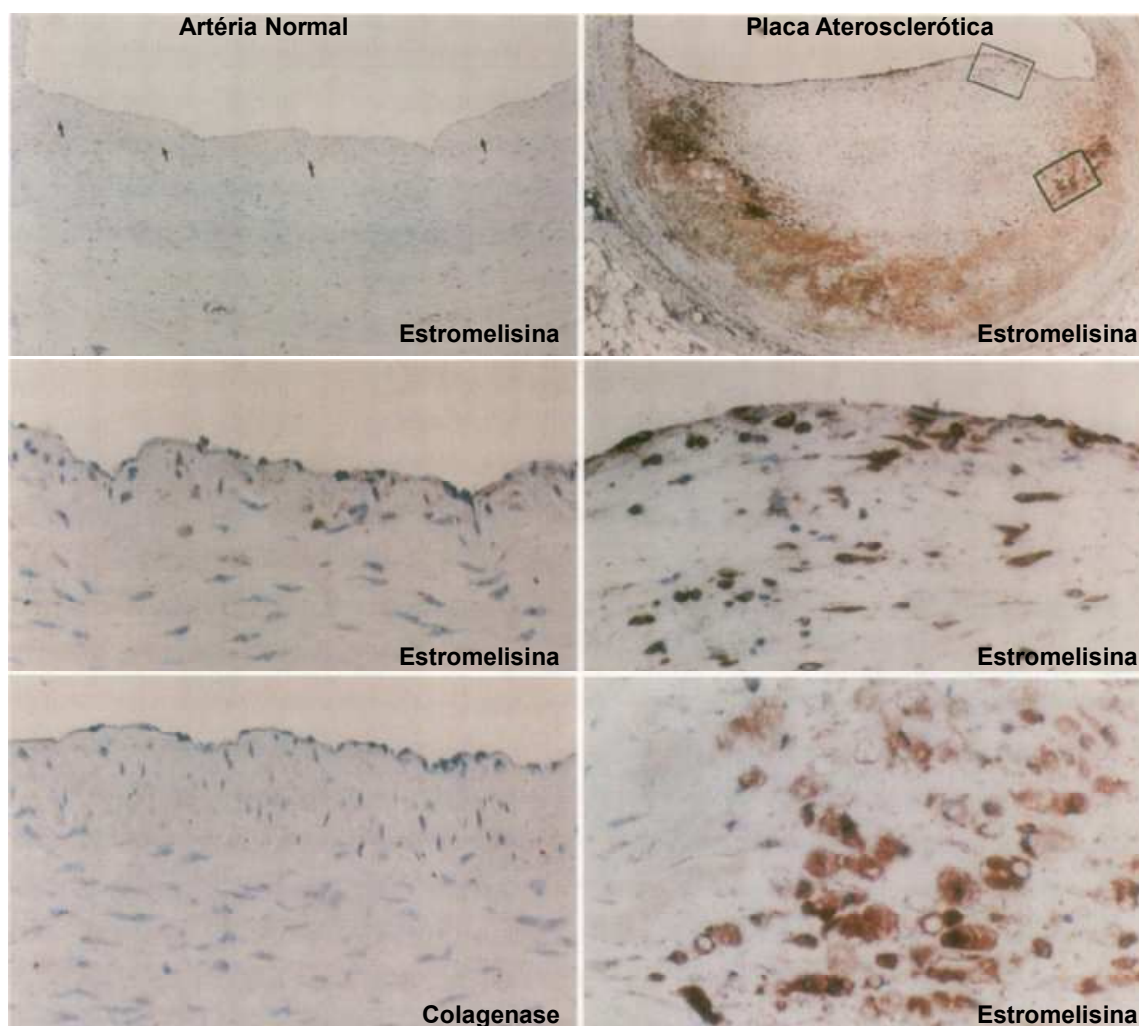
Além disso, níveis plasmáticos elevados de MMP-9 em pacientes com estenose carotídea acima de 50% foram associados com um risco duas vezes maior de AVE ipsilateral e morte cardiovascular (66). Taurino e cols. (67) também demonstraram maiores concentrações plasmáticas de MMP-9 em pacientes com estenose carotídea e lesão cerebral quando comparados com controles saudáveis. Assim, a alteração da atividade das MMPs pode ser uma causa importante de erosão da capa fibrosa, resultando em ruptura e eventos neurológicos agudos (53, 68).

### **1.9 Metaloproteinases de matriz e vulnerabilidade da placa aterosclerótica**

As placas vulneráveis apresentam uma capa fibrosa fina, infiltrado inflamatório, pouco colágeno e níveis elevados de proteases (MMPs), o que pode enfraquecer a capa fibrosa e promover a sua ruptura. Por outro lado, alguns trabalhos demonstraram que as MMPs, através da sua habilidade de facilitar a migração e proliferação de células musculares lisas, são capazes de

promover a estabilização da placa aterosclerótica, evidenciando o duplo efeito destas enzimas no desenvolvimento da doença aterosclerótica. Sendo assim, o papel destas proteases depende do nível de expressão e atividade em cada estágio do desenvolvimento da placa (69).

Estudos histológicos demonstraram que níveis elevados de MMPs podem ser encontrados nas áreas instáveis das placas ateroscleróticas carotídeas (70). Galis e colaboradores (71), analisando a atividade das MMPs-1, -2, -3 e -9 diretamente nos cortes teciduais de placas ateroscleróticas e espécimes de artérias não comprometidas, evidenciaram um aumento na expressão de MMPs nas placas ateroscleróticas, principalmente nas regiões da capa fibrosa propensas à desestabilização (Figura 3).



**Figura 3. Aumento regional da expressão de MMPs nas placas ateroscleróticas. As setas indicam a lâmina elástica interna (superior esquerda, 40X) e detalhes da coloração para estromelisinina e colagenase (central e inferior esquerda, 400X). Os quadros da imagem superior direita demonstram áreas de imunorreatividade (40X), a capa fibrosa (centro direita, 400X) e a porção dos ombros do ateroma (inferior direita, 400X) (Galis et al. [71]).**

Sapienza e cols. (72) analisaram 53 casos consecutivos de EC e demonstraram que nos pacientes com lesões classificadas microscopicamente como instáveis, os níveis séricos de diversas MMPs foram significativamente maiores comparados aos pacientes com lesões estáveis e aos voluntários saudáveis. Ainda, as placas instáveis apresentaram atividade e expressão de MMPs aumentadas. No mesmo estudo, a expressão de TIMP-1 e -2 mostrou-

se diminuída nas lesões ateromatosas instáveis, sugerindo que um desequilíbrio local na atividade desses inibidores pode promover a vulnerabilidade da placa aterosclerótica.

Também já foi demonstrado, por meio de análise imunohistoquímica, que placas ateromatosas vulneráveis apresentam colagenólise intensa mediada por MMP-1 e -3 (73). Além disso, parece haver uma correlação entre alguns tipos de MMPs e a ocorrência de hemorragia intraplaca. Nikkari e cols. (74, 75) observaram a expressão da MMP-1 somente em carótidas humanas com aterosclerose avançada e HIP em comparação a carótidas com íntimas normais.

Mais recentemente, Nooijer e cols. (76), em um estudo experimental com ratos, demonstraram que, em lesões ateroscleróticas intermediárias, a MMP-9 promove a progressão da placa, afinamento da capa fibrosa e remodelamento positivo, não influenciando na incidência de HIP, ruptura ou trombose. Já nas lesões ateroscleróticas avançadas e complexas, a MMP-9 estava relacionada à morfologia da placa vulnerável, acompanhada de alta incidência de HIP. Da mesma forma, Tziakas e cols. (77), em um estudo envolvendo apenas 18 pacientes consecutivos submetidos à EC, demonstraram que a alta concentração de MMPs (particularmente MMP-9) em extratos teciduais, na área de maior estenose, tem relação com a presença de HIP. Entretanto, não encontraram uma correlação entre níveis séricos de MMPs, HIP e instabilidade da placa.

### **1.10 Polimorfismos genéticos das MMPs e doença aterosclerótica**

Como visto anteriormente, a atividade das MMPs pode ser regulada em diversos níveis, incluindo o processo de transcrição (60). Sendo assim, alterações na expressão gênica das MMPs em determinadas áreas da placa, como a capa fibrosa e tecidos adjacentes, podem estar associadas à instabilização da placa aterosclerótica (62). Entretanto, até o momento, poucos estudos avaliaram o papel das variações genéticas das MMPs no contexto da doença aterosclerótica. Estas investigações analisaram prioritariamente a circulação coronariana, embora a aterosclerose carotídea seja uma das principais causas de eventos cerebrovasculares e apareça como alvo de novas pesquisas (1-3).

A estromelina-1 (MMP-3) tem sido preferencialmente estudada, por ter a capacidade de degradar diferentes componentes da matriz e ativar outras MMPs, como as colagenases. O polimorfismo -1171 5A/6A da região promotora do gene da MMP-3 tem sido associado com alterações na taxa de transcrição do gene. Ye e colaboradores (78-80) encontraram a associação do alelo 6A com a progressão da aterosclerose coronariana e, posteriormente, demonstraram maior atividade de transcrição do alelo 5A por meio de estudos de expressão gênica.

Estes achados foram corroborados por outros grupos de investigadores: Ghilardi e colaboradores (81) encontraram uma associação entre o alelo 6A e a gravidade da estenose carotídea; Rauaramaa e colaboradores (82), analisando pacientes com aterosclerose carotídea assintomática, demonstraram associação entre o alelo 6A e o aumento na espessura da camada íntima-

média no sistema carotídeo. Gnasso e colaboradores (83) estudando indivíduos saudáveis, também encontraram uma correlação entre o alelo 6A e a espessura da camada íntima-média carotídea. Estes resultados, em conjunto, sugerem que indivíduos portadores do alelo 6A possuem níveis menores de estromelina nas paredes das artérias, devido a uma redução na transcrição gênica, diminuindo a atividade proteolítica, o que contribui para a deposição de matriz extracelular no lúmen do vaso e predispõe à formação da placa aterosclerótica.

Outras MMPs também apresentam atividade alterada na placa aterosclerótica. Dentre elas, grande atenção tem sido direcionada para a gelatinase B ou MMP-9, que é capaz de degradar colágeno, o principal componente da matriz extracelular, e gelatina (63, 84-86). Fiotti e colaboradores (87) verificaram a associação de um polimorfismo de repetições curtas adjacentes (microsatélite) com aterosclerose de carótida. Além disso, o estudo de um polimorfismo funcional na região promotora do gene da MMP-9 (-1562 C/T) demonstrou um aumento da atividade proteolítica da MMP-9 associado com o alelo T (88). Um trabalho evidenciou a associação do alelo T com lesões coronárias complicadas e instabilidade da placa (89). Outro trabalho, do mesmo grupo, verificou que existe uma significativa interação entre os genótipos das MMPs -3 e -9 com a heterogeneidade das lesões ateroscleróticas. Os pacientes com genótipos considerados de maior atividade (presença dos alelos 5A e T) para ambos os locos apresentavam uma área maior das lesões complicadas quando comparados com os pacientes com genótipos de menor atividade (6A/6A e CC) (90).

O polimorfismo -1607 1G/2G no gene da collagenase intersticial (MMP-1), que degrada colágeno tipo I e III, o principal componente estrutural da placa fibrosa, também foi investigado. O alelo 2G está associado com uma maior atividade da enzima, o que contribui para um aumento na degradação da capa fibrosa e propensão à ruptura (81).

## **2 JUSTIFICATIVA**

A doença oclusiva cerebrovascular é causada primordialmente pela aterosclerose carotídea e tem incidência e prevalência crescentes em países desenvolvidos e no Brasil. Na doença obstrutiva de carótida, os sintomas geralmente são secundários aos fenômenos tromboembólicos provenientes da bifurcação carotídea causando morbidade (déficit hemisférico focal) e mortalidade elevadas. Uma das opções terapêuticas comprovadamente eficazes para a prevenção secundária e primária de novos eventos cerebrovasculares é a endarterectomia carotídea. Porém, o benefício clínico apresenta-se com magnitude variável, de acordo com a presença de sintomas prévios e a gravidade da doença oclusiva carotídea. Embora na atualidade a decisão terapêutica cirúrgica na doença carotídea seja definida pelo percentual de estenose, é reconhecido que os eventos cerebrovasculares são determinados, pelo menos parcialmente, pela instabilização das placas ateroscleróticas. Placas vulneráveis são caracterizadas pela presença de necrose ou de hemorragia intraplaca no seu núcleo, separada do lúmen por

uma capa fibrosa tênue e instável, além de infiltração de células inflamatórias em áreas específicas.

Atualmente, há vários estudos sugerindo que métodos não-invasivos, como a ultrassonografia e a ressonância nuclear magnética (RNM), não somente podem confirmar o percentual de estenose como podem permitir um planejamento cirúrgico adequado. Além disso, também podem revelar características da composição da placa da carótida, possivelmente associadas a maior ou menor suscetibilidade a eventos agudos. Recentemente demonstramos que a RNM pode identificar, com acurácia adequada, a presença de hemorragia intraplaca na avaliação pré-operatória dos pacientes submetidos à endarterectomia.

A aterosclerose é hoje reconhecida como uma doença inflamatória crônica e sistêmica, substituindo o conceito tradicional de entidade relacionada apenas ao acúmulo progressivo de lipídios na parede arterial. Processos inflamatórios participam de todas as etapas da fisiopatologia da doença aterosclerótica, desde sua iniciação até os eventos finais de ruptura da placa. Na doença obstrutiva de carótida, diversos estudos têm procurado esclarecer o papel de vários mediadores inflamatórios envolvidos na formação, no crescimento e possivelmente na instabilização da placa, através da interação com células endoteliais, células musculares lisas, macrófagos e plaquetas, promovendo a liberação de citocinas e de metaloproteinases da matriz extracelular (MMPs).

As MMPs são uma família de enzimas proteolíticas responsáveis pela degradação de diversos componentes da matriz, em particular dos diferentes tipos de colágeno, fibrina e proteoglicanos. A ação destas enzimas no



desenvolvimento e instabilização das placas ateroscleróticas carotídeas já foi bem documentada por diversos estudos experimentais e patológicos. Poucos estudos até o momento, entretanto, avaliaram o papel de variações genéticas das MMPs no contexto da doença aterosclerótica carotídea. Polimorfismos genéticos das MMPs, capazes de alterar a transcrição do gene e sua atividade tecidual, poderiam ajudar a explicar a variabilidade da apresentação clínica e a heterogeneidade do benefício de diferentes terapêuticas na doença oclusiva cerebrovascular.

A estromelisina-1 (MMP-3), a gelatinase B (MMP-9) e a collagenase intersticial (MMP-1) são as proteases mais estudadas no contexto da fisiopatologia da aterosclerose, sendo, desta forma, os genes candidatos mais adequados para a análise de polimorfismos genéticos. Até o momento, nenhum estudo clínico analisou o potencial papel dos níveis séricos e dos polimorfismos das MMP-1, -3 e -9 nas características clínicas, radiológicas (presença de hemorragia intraplaca por RNM) e histopatológicas (deposição de colágeno e espessura da capa fibrosa) de vulnerabilidade da placa aterosclerótica carotídea.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar a associação dos níveis séricos e os polimorfismos genéticos das MMPs -1, -3 e -9 com as características clínicas, radiológicas e histopatológicas de vulnerabilidade da placa aterosclerótica carotídea.

### 3.2 Objetivos específicos

- Determinar a prevalência dos polimorfismos genéticos da MMP-1 (-1607 1G/2G), da MMP-3 (-1171 5A/6A) e da MMP-9 (-1562 C/T) em pacientes submetidos à endarterectomia de carótida.
  
- Determinar os níveis séricos da MMP-1, MMP-3 e MMP-9 em pacientes submetidos à endarterectomia de carótida.
  
- Avaliar a correlação dos marcadores séricos e genéticos acima descritos com as características clínicas (instabilidade dos sintomas neurológicos) dos pacientes submetidos à endarterectomia carotídea.
  
- Avaliar a relação dos marcadores séricos e genéticos acima descritos com as características radiológicas de instabilidade da placa carotídea (achados sugestivos de hemorragia intraplaca na RNM) nos pacientes submetidos à endarterectomia carotídea.
  
- Avaliar a associação dos marcadores séricos e genéticos acima descritos com as características histopatológicas de instabilidade da placa carotídea (deposição de colágeno e espessura da capa fibrosa) nos pacientes submetidos à endarterectomia carotídea.

- Avaliar a relação entre os níveis séricos e os polimorfismos genéticos das MMPs -1, -3 e -9 nos pacientes submetidos à endarterectomia carotídea.
  
- Avaliar a associação dos marcadores séricos e genéticos acima descritos com marcadores inflamatórios (proteína C reativa e pentraxina-3).

#### 4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lopez AD, Mathers CD, Ezzati M, Jamison DT, Murray CJL. Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data. *Lancet* 2006; 367: 1747-1757.
2. Organização Pan-Americana da Saúde. Indicadores básicos para a saúde no Brasil: conceitos e aplicações. Rede Interagencial de Informação para a Saúde – Ripsa – 2ª Edição – Brasília 2008. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/idb2006/indicadores.pdf>>. Acesso em: 08 Jan. 2011.
3. Donnan GA, Fisher M, Macleod M, Davis SM. Stroke. *Lancet* 2008; 371: 1612-1623.
4. Hankey GJ. Stroke: how large a public health problem and how can the neurologist help? *Arch Neurol* 1999; 56: 748-754.
5. Pasternak RC, Criqui MH, Benjamin EJ, Fowkes FG, Isselbacher EM, McCullough PA, Wolf PA, Zheng ZJ. Atherosclerotic Vascular Disease Conference: Writing Group I: Epidemiology. *Circulation* 2004; 109: 2605-2612.
6. Sacco RL, Adams R, Albers G, Alberts MJ, Benavente O, Furie K, Goldstein LB, Gorelick P, Halperin J, Harbaugh R, Johnston SC, Katzan I, Kelly-Hayes M, Kenton EJ, Marks M, Schwamm LH, Tomsick T. Guidelines for prevention of stroke in patients with ischemic stroke or transient ischemic attack: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association Council on Stroke. *Stroke* 2006; 37: 577-617.

7. Goldstein LB, Adams R, Alberts MJ, Appel LJ, Brass LM, Bushnell CD, Culebras A, Degraza TJ, Gorelick PB, Guyton JR, Hart RG, Howard G, Kelly-Hayes M, Nixon JV, Sacco RL. Primary prevention of ischemic stroke: a guideline from the American Heart Association/American Stroke Association Stroke Council. *Stroke* 2006; 37: 1583-1633.
8. Sitzler M, Muller W, Siebler M, Hort W, Kneimeyer HW, Janke L, Steinmetz H. Plaque ulceration and lumen thrombus are the main sources of cerebral microemboli in high-grade internal carotid artery stenosis. *Stroke* 1995; 26: 1231-1233.
9. Albuquerque LC, Narvaes LB, Filho JRH, Anes M, Maciel AA, Staub H, Rohde LE. Vulnerabilidade da doença aterosclerótica de carótidas: do laboratório à sala de cirurgia – parte I. *Rev Bras Cir Cardiovasc* 2006; 21: 127-135.
10. Moore WS, Quinones-Baldrich W, Krupski WC. Indications, surgical technique and results for repair of extracranial occlusive lesions. In: Rutherford RB editor. *Vascular Surgery*. 5<sup>th</sup> edition. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 2000. pp1713-1730.
11. Imparato AM. Carotid endarterectomy: indications and techniques for carotid surgery. In: Ascher E, editor. *Haimovici's Vascular Surgery*. 5<sup>th</sup> edition. Oxford: Blackwell Publishing; 2004. pp. 787-809.
12. Goldstein LB. Extracranial carotid artery stenosis. *Stroke* 2003; 34: 2767-2773.
13. Howell SJ. Carotid endarterectomy. *Br J Anaesth* 2007; 99: 119-131.
14. Hobson RW 2nd, Mackey WC, Ascher E, Murad MH, Calligaro KD, Comerota AJ, Montori VM, Eskandari MK, Massop DW, Bush RL, Lal BK,

- Perler BA. Management of atherosclerotic carotid artery disease: clinical practice guidelines of the Society for Vascular Surgery. *J Vasc Surg* 2008; 48: 480-486.
15. Bonamigo TP, Lucas ML. A endarterectomia carotídea é a melhor opção para os pacientes com doença carotídea. *Arq Bras Cardiol* 2008; 91: e29-e32.
  16. North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial Collaborators. Beneficial effect of carotid endarterectomy in symptomatic patients with high-grade carotid stenosis. *N Eng J Med* 1991; 325: 445-453.
  17. European Carotid Surgery Trialists' Collaborative Group: MRC European Carotid Surgery Trial. Interim results for symptomatic patients with severe (70-99%) or with mild (0-29%) carotid stenosis. *Lancet* 1991; 337: 1235-1243.
  18. Executive Committee for the Asymptomatic Carotid Atherosclerosis Study. Endarterectomy for asymptomatic carotid artery stenosis. *JAMA* 1995; 273: 1421-1428.
  19. Halliday AW for the Steering Committee and for the Collaborators. The Asymptomatic Carotid Surgery Trial (ACST): rationale and design. *Eur J Vasc Surg* 1994; 8: 703-710.
  20. Golledge J, Greenhalgh RM, Davies AH. The symptomatic carotid plaque. *Stroke* 2000; 31: 774-781.
  21. Hatsukami TS, Ferguson MS, Beach KW, Gordon D, Detmer P, Burns D, Alpers C, Strandness DE Jr. Carotid plaque morphology and clinical events. *Stroke* 1997; 28: 95-100.

22. Davies MJ. Stability and instability: two faces of coronary atherosclerosis. *Circulation* 1996; 94: 2013-2020.
23. Nighoghossian N, Derex L, Douek P. The vulnerable carotid artery. *Stroke* 2005; 36: 2764-2772.
24. Saam T, Hatsukami TS, Takaya N, Chu B, Underhill H, Kerwin WS, Cai J, Ferguson MS, Yuan C. The vulnerable, or high-risk, atherosclerotic plaque: noninvasive MR imaging for characterization and assessment. *Radiology* 2007; 244: 64-77.
25. Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Schwartz SM. Lesions from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 1262-1275.
26. Lusby RJ, Ferrel LD, Ehrenfeld WK, Stoney RJ, Wylie EJ. Carotid plaque hemorrhage. Its role in production of cerebral ischemia. *Arch Surg* 1982; 117: 1479-1488.
27. Mofidi R, Crotty TB, McCarthy P, Sheehan SJ, Mehigan D, Keaverry TV. Association between plaque instability, angiogenesis and symptomatic carotid occlusive disease. *Br J Surg* 2001; 88: 945-950.
28. Moody AR, Murphy RE, Morgan PS, Martel AL, Delay GS, Alder S, MacSweeney ST, Tennant WG, Gladman J, Lowe J, Hunt BJ. Characterization of complicated carotid plaque with magnetic resonance: direct thrombus imaging in patients with cerebral ischemia. *Circulation* 2003; 107: 3047-3052.
29. Burke AP, Kolodgie FD, Farb A, Weber DK, Malcom GT, Smialek J, Virmani R. Healed plaque ruptures and sudden coronary death: evidence

- that subclinical rupture has a role in plaque progression. *Circulation* 2001; 103: 934-940.
30. Geroulakos G, Domjan J, Nocolaides A, Stevens J, Labropouos N, Ramaswami G, Belcaro G, Mansfield A. Ultrasonic carotid artery plaque structure and the risk of cerebral infarction on computed tomography. *J Vasc Surg* 1994; 20: 263-266.
  31. Beach KW, Hatsukami T, Detmer PR, Primozych JF, Ferguson MS, Gordon D, Alpers CE, Burns DH, Thackray BD, Strandness DE Jr. Carotid artery intraplaque hemorrhage and stenotic velocity. *Stroke* 1993; 24: 314-319.
  32. Chambless LE, Folsom AR, Clegg LX, Sharrett AR, Shahar E, Nieto FJ, Rosamond WD, Evans G. Carotid wall thickness is predictive of incident clinical stroke: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Am J Epidemiol* 2000; 151: 478-487.
  33. Hatsukami TS, Ross R, Polissar NL, Yuan C. Visualization of fibrous cap thickness and rupture in human atherosclerotic carotid plaque in vivo with high-resolution magnetic resonance imaging. *Circulation* 2000; 102: 959-964.
  34. Rohde LE, Lee RT. Pathophysiology of atherosclerotic plaque development and rupture: an overview. *Semin Vasc Med* 2003; 3: 347-354.
  35. Rotwell PM, Gutnikov SA, Warlow CP; European Carotid Surgery Trialist's Collaboration. Reanalysis of the final results of the European Carotid Surgery Trial. *Stroke* 2003; 34: 514-523.



36. Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Finn AV, Gold HK, Tulenko TN, Wrenn SP, Narula J. Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture. Angiogenesis as a source of intraplaque hemorrhage. *Arterioscler Vasc Biol* 2005; 25: 2054-2061.
37. Kwee RM, van Oostenbrugge RJ, Hofstra L, Teule GJ, Engelshoven JM, Mess WH, Kooi ME. Identifying vulnerable carotid plaques by noninvasive imaging. *Neurology* 2008; 70: 2401-2409.
38. Spagnolli LG, Mauriello A, Sangiorgy G, Fratoni S, Bonanno E, Schwartz RS, Piepgras DG, Pistolesse R, Ippoliti A, Holmes DR Jr. Extracranial thrombotically active carotid plaque as a risk factor for ischemic stroke. *JAMA* 2004; 20: 1845-1852.
39. Redgrave JNE, Lovett JK, Gallagher PJ, Rothwell PM. Histological assessment of 526 symptomatic carotid plaques in relation to the nature and timing of ischemic symptoms. The Oxford Plaque Study. *Circulation* 2006; 113: 2320-2328.
40. Naghavi M, Libby P, Falk E, Casscells SW, Litovsky S, Rumberger J, Badimon JJ, Stefanadis C, Moreno P, Pasterkamp G, Fayad Z, Stone PH, Waxman S, Raggi P, Madjid M, Zarrabi A, Burke A, Yuan C, Fitzgerald PJ, Siscovick DS, de Korte CL, Aikawa M, Juhani Airaksinen KE, Assmann G, Becker CR, Chesebro JH, Farb A, Galis ZS, Jackson C, Jang IK, Koenig W, Lodder RA, March K, Demirovic J, Navab M, Priori SG, Rekhter MD, Bahr R, Grundy SM, Mehran R, Colombo A, Boerwinkle E, Ballantyne C, Insull W Jr, Schwartz RS, Vogel R, Serruys PW, Hansson GK, Faxon DP, Kaul S, Drexler H, Greenland P, Muller JE, Virmani R, Ridker PM, Zipes DP, Shah PK, Willerson JT. From vulnerable plaque to vulnerable patient:

- a call for new definition and risk assessment strategies: part I. *Circulation* 2003; 108: 1664-1672.
41. Chu B, Kampschulte A, Ferguson MS, Kerwin WS, Yarnykh VL, O'Brien KD, Polissar NL, Hatsukami TS, Yuan C. Hemorrhage in the atherosclerotic carotid plaque: a high-resolution MRI study. *Stroke* 2004; 35: 1079-1084.
  42. Takaya N, Yuan C, Chu B, Saam T, Polissar NL, Jarvik GP, Isaac C, McDonough J, Natiello C, Small R, Ferguson MS, Hatsukami TS. Presence of intraplaque hemorrhage stimulates progression of carotid atherosclerotic plaques. A high-resolution magnetic resonance imaging study. *Circulation* 2005; 111: 2768-2775.
  43. Takaya N, Yuan C, Chu B, Saam T, Underhill H, Cai J, Tran N, Polissar NL, Isaac C, Ferguson MS, Garden GA, Cramer SC, Maravilla KR, Hashimoto B, Hatsukami TS. Association between carotid plaque characteristics and subsequent ischemic cerebrovascular events. A prospective assessment with MRI – initial results. *Stroke* 2006; 37: 818-823.
  44. Altaf N, MacSweeney ST, Gladman J, Auer DP. Carotid intraplaque hemorrhage predicts recurrent symptoms in patients with high-grade carotid stenosis. *Stroke* 2007; 38: 1633-1635.
  45. Albuquerque LC, Narvaes LB, Maciel AA, Staub H, Friedrich M, Filho JR, Marques MB, Rohde LE. Intraplaque hemorrhage assessed by high-resolution magnetic resonance and C-reactive protein in carotid atherosclerosis. *J Vasc Surg* 2007; 46: 1130-1137.

46. Kolodgie FD, Gold HK, Burke AP, Fowler DR, Kruth HS, Weber DK, Farb A, Guerrero LJ, Hayase M, Kutys R, Narula J, Finn AV, Virmani R. Intraplaque hemorrhage and progression of coronary atheroma. *N Engl J Med* 2003; 349: 2316-2325.
47. Buttari B, Profumo E, Petrone L, Pietraforte D, Siracusano A, Margutti P, Delunardo F, Ortona E, Minetti M, Salvati B, Riganò R. Free hemoglobin: a dangerous signal for the immune system in patients with carotid atherosclerosis? *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1107: 42-50.
48. Ross R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340: 115-126.
49. Hansson GK, Libby P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 508-519.
50. EUROASPIRE: A European Society of Cardiology survey of secondary prevention of coronary heart disease: principal results. *Eur Heart J* 1997; 18: 1569-1582.
51. Rothwell PM, Villagra R, Gibson R, Donders RC, Warlow CP. Evidence of a cause systemic of instability of atherosclerotic plaques. *Lancet* 2000; 355: 19-24.
52. Landmesser U, Hornig B, Drexler H. Endothelial function: a critical determinant in atherosclerosis? *Circulation* 2004; 109(21 Suppl 1): II27-33.
53. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002; 420: 868-874.
54. Mullenix PS, Andersen CA, Starnes BW. Atherosclerosis as inflammation. *Ann Vasc Surg* 2005; 19: 130-138.
55. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002; 105: 1135-1143.

56. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* 2011; 473: 317-325.
57. Stoll G, Bendszus M. Inflammation and atherosclerosis – novel insights into plaque formation and destabilization. *Stroke* 2006; 37: 1923-1932.
58. Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* 2006; 69: 562-573.
59. Vu TH, Werb Z. Matrix metalloproteinase: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev* 2000; 14: 2123-2133.
60. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 2006; 92: 827-839.
61. Blankenberg S, Rupprecht HJ, Poirier O, Bickel C, Smieja M, Hafner G, Meyer J, Cambien F, Tiret L. Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase 9 and prognosis of patients with cardiovascular disease. *Circulation* 2003; 107: 1579-1585.
62. Dollery CM, Libby P. Atherosclerosis and proteinase activation. *Cardiovasc Res* 2006; 69: 625-635.
63. Alvarez B, Ruiz C, Chacón P, Sabin JA, Matas M. Serum values of metalloproteinase-2 and metalloproteinase-9 as related to unstable plaque and inflammatory cells in patients with greater than 70% carotid artery stenosis. *J Vasc Surg* 2004; 40: 469-475.
64. Verhoeven B, Hellings WE, Moll FL, de Vries JP, Kleijn DPV, Bruin P, Busser E, Schoneveld AH, Pasterkamp G. Carotid atherosclerotic plaques in patients with transient ischemic attacks and stroke have unstable

- characteristics compared with plaques in asymptomatic and amaurosis fugax patients. *J Vasc Surg* 2005; 42: 1075-1081.
65. Kunte H, Kunte G, Busch MA, Weichert W, Rückert RI, Harms L. Differences in carotid plaque content of macrophages, T cells and MMP-9 between patients with embolic and hemodynamic cerebral ischemia due to symptomatic carotid stenosis. *Atherosclerosis* 2010; 211: 456-460.
66. Eldrup N, Gronholdt MM, Sillesen H, Nordestgaard BG. Elevated matrix metalloproteinase-9 associated with stroke or cardiovascular death in patients with carotid stenosis. *Circulation* 2006; 114: 1847-1854.
67. Taurino M, Raffa S, Mastroddi M, Visco V, Rizzo L, Torrisi MR, Faraglia V. Metalloproteinases expression in carotid plaque and its correlation with plasma levels before and after carotid endarterectomy. *Vasc Endovascular Surg* 2008; 41: 516-521.
68. Hermus L, Lefrandt JD, Tio RA, Breek JC, Zeebregts CJ. Carotid plaque formation and serum biomarkers. *Atherosclerosis* 2010; doi:10.1016/j.atherosclerosis.2010.05.013.
69. Newby AC. Metalloproteinases and vulnerable atherosclerotic plaques. *Trends Cardiovasc Med* 2007; 17: 253-258.
70. Loftus IM, Naylor AR, Goodall S, Crowther M, Jones L, Bell PR, Thompson MM. Increased matrix metalloproteinase-9 activity in unstable carotid plaques. A potential role in acute plaque disruption. *Stroke* 2000; 31: 40-47.
71. Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 1994; 94: 2493-2503.

72. Sapienza P, di Marzo L, Borrelli V, Sterpetti AV, Mingoli A, Cresti S, Cavallaro A. Metalloproteinases and their inhibitors are markers of plaque instability. *Surgery* 2005; 137: 355-363.
73. Sukhova GK, Schönbeck U, Rabkin E, Schoen FJ, Poole AR, Billingham RC, Libby P. Evidence for increased collagenolysis interstitial collagenases-1 and -3 in vulnerable human atheromatous plaques. *Circulation* 1999; 99: 2503-2509.
74. Nikkari ST, O'Brian KD, Ferguson M, Hatsukami T, Welgus HG, Alpers CE, Clowes AW. Interstitial collagenase (MMP-1) expression in human carotid atherosclerosis. *Circulation* 1995; 92: 1393-1398.
75. Nikkari ST, Geary RL, Hatsukami T, Ferguson M, Forough R, Alpers CE. Expression of collagen, interstitial collagenase, and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in restenosis after carotid endarterectomy. *Am J Pathol* 1996; 148: 777-783.
76. Nooijer R, Verkleij CJ, von der Thüsen JH, Jukema JW, van der Wall EE, van Berkel JC, Biessen EA. Lesional overexpression of matrix metalloproteinase-9 promotes intraplaque hemorrhage in advanced lesions but not at earlier stages of atherogenesis. *Arterioscler Vasc Biol* 2006; 26: 340-346.
77. Tziakas DN, Lazarides MK, Tentis IK, Georgiadis GS, Eleftheriadou E, Chalikias GK, Kortsaris A, Hatseras DI. Gelatinases [matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9] induce carotid plaque instability but their systemic levels are not predictive of local events. *Ann Vasc Surg* 2005; 19: 529-533.

78. Ye S, Watts GF, Mandalia S, Humphries SE, Henney AM. Preliminary report: genetic variation in the human stromelysin promoter is associated with progression of coronary atherosclerosis. *Br Heart J* 1995; 73: 209–215.
79. Ye S, Eriksson P, Hamsten A, Kurkinen M, Humphries SE, Henney AM. Progression of coronary atherosclerosis is associated with a common genetic variant of the human stromelysin-1 promoter which results in reduced gene expression. *J Biol Chem* 1996; 271: 13055–13060.
80. Humphries SE, Luong LA, Talmud PJ, Frick MH, Kesaniemi YA, Pasternack A, Taskinen MR, Syväne M. The 5A/6A polymorphism in the promoter of the stromelysin-1 (MMP-3) gene predicts progression of angiographically determined coronary artery disease in men in the LOCAT gemfibrozil study. Lipid Coronary Angiography Trial. *Atherosclerosis* 1998; 139: 49–56.
81. Ghilardi G, Biondi ML, DeMonti M, Turri O, Guagnellini E, Scorza R. Matrix metalloproteinase-1 and matrix metalloproteinase-3 gene promoter polymorphisms are associated with carotid artery stenosis. *Stroke* 2002; 33: 2408–2412.
82. Rauramaa R, Vaisanen SB, Luong LA, Schmidt-Trucksass A, Penttila IM, Bouchard C, Töyry J, Humphries SE. Stromelysin-1 and interleukin-6 gene promoter polymorphisms are determinants of asymptomatic carotid artery atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 2657–2662.
83. Gnasso A, Motti C, Irace C, Carallo C, Liberatoscioli L, Bernardini S, Massoud R, Mattioli PL, Federici G, Cortese C. Genetic variation in human

- stromelysin gene promoter and common carotid geometry in healthy male subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 1600–1605.
84. Oostrom OV, Velema E, Schoneveld AH, Vries JPPM, Bruin P, Seldenrijk CA, Kleijn DPV, Busser E, Moll FL, Verheijen JH, Virmani R, Pasterkamp G. Age-related changes in plaque composition. A study in patients suffering from carotid artery stenosis. *Cardiovasc Pathol* 2005; 14: 126-134.
85. Nanni S, Melandri G, Hanemijer R, Cervi V, Tomasi T, Altimari A, Lent NV, Tricoci P, Bacchi L, Branzi A. Matrix metalloproteinases in premature coronary atherosclerosis: influence of inhibitors, inflammation, and genetic polymorphisms. *Transl Res* 2007; 149: 137-144.
86. Choudhary S, Higgins CL, Chen IY, Reardon M, Lawrie G, Vick GW, Karmonik C, Via DP, Morrisett JD. Quantitation and localization of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human carotid endarterectomy tissues. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 2351-2358.
87. Fiotti N, Altamura N, Fisicaro M, Carraro N, Uxa L, Grassi G, Torelli L, Gobbato R, Guarnieri G, Baxter BT, Giansante C. MMP-9 microsatellite polymorphism and susceptibility to carotid arteries atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 1330-1336.
88. Zhang B, Henney A, Eriksson P, Hamsten A, Watkins H, Ye S. Genetic variation at the matrix metalloproteinase-9 locus on chromosome 20q12.2–13.1. *Hum Genet* 1999; 105: 418–423.
89. Pöllänen PJ, Karhunen PJ, Mikkelsen J, Laippala P, Perola M, Penttilä A, Mattila KM, Koivula T, Lehtimäki T. Coronary artery complicated lesion area is related to functional polymorphisms of matrix metalloproteinase 9



- gene: an autopsy study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 1446-1450.
90. Pöllänen PJ, Lehtimäki T, Mikkelsen J, Ilveskoski E, Kunnas T, Perola M, Penttilä A, Mattila KM, Ninkari ST, Syrjäkoski K, Karhunen PJ. Matrix metalloproteinase 3 and 9 gene promoter polymorphisms: joint action of two loci as a risk factor for coronary artery complicated plaques. *Atherosclerosis* 2005; 180: 73-79.

## 5 ARTIGO ORIGINAL

### **Association Study of Matrix Metalloproteinases Polymorphisms with Serum Levels and Characteristics of Vulnerability in Carotid Atherosclerosis**

Daiane Silvello BSc, Luciane B. Narvaes MD MSc, Luciano C. Albuquerque  
MD ScD, Luis F. Forgiarini BSc, Luise Meurer MD ScD, Katia G. Santos ScD,  
Luis E. Rohde MD ScD

From the Pathology Division and the Cardiology Division of Hospital de Clínicas  
de Porto Alegre, the Adult Cardiovascular Surgery Division from São Lucas  
Hospital of the Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul and  
Postgraduate Program in Cardiology and Cardiovascular Sciences of the  
Federal University of Rio Grande do Sul

Address for Correspondence:

Luis E. Rohde, MD

Post-graduate Program in Cardiology and Cardiovascular Sciences of the  
Federal University of Rio Grande do Sul

Rua Ramiro Barcelos 2350, Room 2060, Second Floor

Telephone – +55 51 33598659; Fax – +55 51 33598657

e-mail [lerohde@terra.com.br](mailto:lerohde@terra.com.br)

## 5.1 Abstract

**Background** – An atherosclerotic plaque undergoes continuous remodeling overtime, mediated in part by changes in extracellular matrix components. Development of an unstable plaque has been attributed to the action of matrix metalloproteinases (MMPs).

**Methods** – In the present cross-sectional study we investigated the potential association of genetic polymorphisms and serum levels of MMP-1, MMP-3 and MMP-9 with histopathologic and clinical characteristics of vulnerability of the carotid atherosclerotic plaque in patients submitted to carotid endarterectomy. Genotyping was done using the polymerase chain reaction (PCR) followed by enzyme restriction digestion method and serum levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

**Results** – The study comprised 99 predominantly male (64%) and hypertensive (89%) patients ( $67 \pm 9$  years old). Patients homozygous for the 5A allele of the MMP-3 gene (-1171 5A/6A) had higher MMP-3 serum levels. Carriers of the 2G allele (MMP-1 -1607 1G/2G) presented higher levels of pentraxin-3 (PTX-3) and high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP). MMP-9 serum levels had a strong and statistically significant correlation with PTX-3 levels ( $r=0.7$  and  $p<0.001$ ). In addition, MMP-9 serum levels was significantly increased in patients with previous stroke ( $p=0.009$ ), peripheral vascular disease ( $p=0.049$ ), as well in patients with acute or recent intraplaque hemorrhage ( $p=0.008$ ) and a thinner fibrous cap ( $p=0.033$ ) on histology. No reliable significant associations were

observed among different MMPs genotypes and fibrous cap thickness, intraplaque hemorrhage and collagen content.

**Conclusions** – MMPs polymorphisms were not associated with characteristics of plaque vulnerability. Serum levels of MMPs, particularly MMP-9, were involved in the process related to atherosclerotic vulnerability and progression.

**Key words:** atherosclerosis, matrix metalloproteinases, vulnerability, carotid plaque.

## 5.2 Introduction

Cerebral vascular disease is an important cause of stroke and transient ischemic attack (TIA) and it remains as a major cause of morbidity and mortality in the adult population (1). Carotid endarterectomy is the most widely accepted interventional treatment strategy for carotid atherosclerosis (2) and its indication is based primarily on the degree of luminal stenosis (3,4). However, strong clinical and histopathologic evidences indicate that acute vascular events occur mostly due to the instability of vulnerable plaques (5,6). The vulnerability is dictated in part by plaque morphology, which is influenced by pathophysiological mechanisms at the cellular and molecular level. The unstable plaque is characterized by a thin and at times ulcerated fibrous cap that usually evolves to plaque rupture (8).

An atherosclerotic plaque undergoes continuous evolution overtime, mediated in part by extracellular matrix remodeling (8). Development of a complicated and unstable plaque has been attributed to the action of matrix

metalloproteinases (MMPs) that are secreted predominantly by macrophages present in the lesion (9). MMPs form a family of zinc-dependent enzymes with proteolytic activity that is responsible for the degradation of extracellular matrix proteins such as collagens, proteoglycans, fibronectin and elastin. Several of these enzymes are overexpressed in the shoulder regions of atherosclerotic plaques and participate in the processes that lead to plaque destabilization, particularly by degrading the fibrous cap (10,11).

Several functional polymorphisms in the promoter regions of the MMPs genes have been reported (12-19). For instance, the -1171 5A/6A common variant of the MMP-3 gene revealed that the 5A allele had a 2-fold higher promoter activity than the 6A allele (12). Previous studies have shown that the 6A allele is associated to carotid stenosis, increased intima-media thickness, but paradoxically higher levels of active MMP-3 in the blood (13-17). Therefore, subjects carrying the 6A allele tend to accumulate extracellular matrix because of decreased degradation.

MMP-1 is expressed in advanced carotid atherosclerotic plaques and homozygosity for the 2G allele (-1607 1G/2G polymorphism) in the gene promoter results in an increased proteolytic activity, leading to higher instability of the whole lesion (14). Fiotti *et al* (18) have demonstrated that 1G carriers had smaller and more stable carotid plaques, as well as better prognosis after acute vascular events. Another common functional polymorphism is the -1562 C/T in MMP-9 gene promoter, which leads to low- (CC) and high-transcription (CT/TT) genotypes. The T allele has been associated to complicated coronary artery plaques (19).

In the present study we evaluated consecutive patients submitted to carotid endarterectomy to investigate the potential association of genetic polymorphisms and serum levels of MMP-1, MMP-3 and MMP-9 with histopathologic and clinical characteristics of vulnerability of the carotid atherosclerotic plaque. In particular, we evaluated the relationship of these genetic and blood-derived markers with the presence of intraplaque hemorrhage, collagen deposit and fibrous cap thickness, as well as with clinical events such as stroke, peripheral vascular disease and other comorbidities.

### **5.3 Methods**

#### **5.3.1 Patients**

The present cross-sectional study enrolled 99 patients with definite carotid atherosclerotic disease and internationally-accepted, guideline-based criteria for carotid endarterectomy (20,21). Patients were selected between December 2004 and December 2007, at the Cardiovascular Surgery Division of the São Lucas Hospital of the Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul. Patients suffering from known infectious or autoimmune diseases were excluded from the protocol. Patients with severe peripheral arterial disease (pain at rest, ischemic cutaneous lesions or gangrene), as well as patients with acute coronary syndromes and those submitted to recent surgical or percutaneous interventions (< 90 days before endarterectomy) were also excluded, as all these conditions might increase serum inflammatory markers. The present protocol was approved by the Ethics Committee of the institutions

involved in the study and all patients signed a written informed consent form before enrollment.

### **5.3.2 Magnetic resonance imaging (MRI)**

All MRI exams were performed on a Siemens Magnetom Vision Plus apparatus (Siemens® Inc., Erlangen, Germany). The MRI protocol included two different contrast-weighted images: time of flight (TOF) to estimate level of angiographic stenosis and T1-weighted (T1W) sequence to assess intraplaque hemorrhage, using the same image window acquisition. This technique was similar to the protocol described by Moody *et al* (22). Luminal stenosis was determined according to *NASCET* criteria (23) and the graduation of stenosis was adapted from Nederkoorn *et al* (24), divided into three categories: 50 to 69% stenosis, 70 to 90% stenosis, and stenosis greater than 90%. All MRIs were interpreted by two experienced blinded neurologists. Plaque length was measured and the proximal and distal margins were defined for comparisons with histology findings.

### **5.3.3 Clinical characterization**

All patients were classified according to the presence and evolution of neurological symptoms, assessed by an experienced neurologist who was unaware of MRI data or other clinical variables. Patients were classified as (1) unstable (or recently symptomatic), defined as the presence of ipsilateral hemispheric symptoms in patients in whom plaques were removed within 90 days of the event, or (2) stable (asymptomatic or remotely symptomatic), defined as patients with no ipsilateral neurological symptoms whatsoever or

with ipsilateral hemispheric symptoms, but with endarterectomy performed more than 90 days after the event.

#### **5.3.4 Serum markers**

In the operating room, before anesthetic induction, 20 mL of blood were drawn from a peripheral vein and immediately processed. MMP-1, MMP-3 and MMP-9 serum levels were determined with a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), using Biotrak assay system (Biotrak®, Buckinghamshire, UK), validated for use with human serum. ELISA was performed according to the manufacturer's instructions.

#### **5.3.5 Genotyping**

Genomic DNA was extracted from peripheral blood according to a salting out method as previously described (25). The polymerase chain reaction (PCR) method was used to amplify fragments containing the MMP-1 -1607 1G/2G, MMP-3 -1171 5A/6A, and MMP-9 -1562 C/T polymorphisms, using primers and conditions as described by Dunleavey *et al* (26,27) and Zhang *et al* (28), respectively. The PCR products were then subjected to digestion by restriction endonuclease *XmnI* or *PaeI* following the manufacturer's instructions (MBI Fermentas, St Leon-Rot, Germany). The digested fragments were separated by electrophoresis in 8% polyacrylamide gels and visualized with silver nitrate staining (MMP-1 and MMP-3 polymorphisms) or in 2% agarose gels and visualized with ethidium bromide under ultraviolet light (MMP-9 polymorphism).



### 5.3.6 Histological analysis

Carotid plaques were collected at the time of the surgery and kept for 24 hours in 10% formaldehyde solution, cleared with xylene, and embedded in blocks of paraffin (approximately three blocks per patient). Tissue sections of 5  $\mu\text{m}$  were cut from paraffin tissue blocks with a microtome (Leitz® 1512, Ernst Leitz, Vienna, Austria). Sections were performed along all blocks with an approximate interval of 150  $\mu\text{m}$ , throughout the extent of the carotid plaque.

Histological sections were stained with Picrosirius Red for collagen content, lipid core and fibrous cap thickness analyses and hematoxylin-eosin to detect the presence of intraplaque hemorrhage.

Quantitative analysis was carried out using a Nikon Labophot optical microscope (Tokyo, Japan). The histomorphometric analysis was done using a digital camera connected to an image capture board of a computer running the QCapture Pro 5.1 (Qimaging®, Surrey, Canada).

Histopathological analyses were carried out in a selected group of patients ( $n = 15$ ) with genotypes that were expected to represent patients with the highest and lowest MMPs activity (12,14,19). For instance, we selected blocks from all patients that carried at least two alleles that have been associated with higher MMP-1, MMP-3 and MMP-9 activity. Conversely, we also selected blocks from all patients with at least four alleles that have been linked to low MMPs activity (Supplementary Table 1).

**Percentage of collagen:** Percentage of collagen was determined by histomorphometric analysis using a digital camera connected to an image capture board of a computer running the Adobe Photoshop CS3 Extended 10.0 software (Adobe Systems Inc, San Jose, CA, USA). From each selected

section, we analyzed the content of collagen of the whole atherosclerotic plaque, based on non-polarized Picrosirius Red staining. Every image exhibited on the monitor was adjusted to the same threshold level, and the area of structures was measured in pixels. The total amount of pixels per image remained constant in all fields. The percentage of fibrosis in each image was then calculated using the ratio of red stained pixels in relation to the the total of pixels on the board. Similar approach has been previously used (29).

**Fibrous cap thickness (FCT):** From the original blocks, all sections (n = 120) from the 15 selected patients were visually evaluated. Sections within the site of tightest arterial stenosis or where the fibrous cap was particularly thinned were digitized and used for FCT measurement. Sections for FCT analysis were stained with non-polarized Picrosirius Red, as depicted on Figure 1. FCT measurements were performed with a simple length-measurement computer system, where pixels were transformed to micrometers based on a scale set for each image, using the ImageJ 1.44p software (National Institutes of Health, USA). Measurements were taken at regular intervals ranging from 150 to 200  $\mu\text{m}$  and were restricted to regions with clear demarcation of the fibrous cap-lipid core interface, and always including the shoulder region of the plaque. For each section, approximately 10 FCT measurements were performed (Figure 1). The number of FCT measurements fluctuated for each section due to the complex morphology of carotid atherosclerotic plaques (size, shape, and demarcation of the fibrous cap-lipid core interface substantially differed among cases). For each section, the minimal, maximal, and mean value was obtained. The protocol for FCT analysis was modified from Devuyst *et al* (30).

**Lipid core/pool:** To analyze the lipid core, the same protocol and software were used, analyzing the total area of the atherosclerotic plaque, the area of the lipid core and their ratio (ImageJ 1.44p software; National Institutes of Health, USA).

**Intraplaque hemorrhage:** Characterization of intraplaque hemorrhage was adapted from Lusby *et al* (31), as previously described (32). For statistical analysis, acute and recent bleeding were aggregated and defined as current intraplaque hemorrhage. Late or absent bleeding were also aggregated and defined as old or absent intraplaque hemorrhage. Analysis of histopathology was performed by an experienced pathologist (LM) who was unaware of clinical and laboratory data.

### 5.3.7 Statistical analysis

Continuous variables with normal distribution are expressed as mean  $\pm$  standard deviation and compared using Student t test or analysis of variance (ANOVA). MMP-1 values underwent logarithmic transformation as they did not have normal distribution and were also compared using the Student t test or ANOVA, with post-hoc analysis when appropriate. Square root MMP-3 was used for statistical analysis, because logarithmic transformation was not satisfactory to normalize the distribution. Categorical variables were expressed as frequencies and percentages. For comparisons between different groups, the chi-square test or Fisher's exact test were used. A two-tailed p value lower than 0.05 was considered statistically significant. Analyses were performed using SPSS statistical package (version 18.0).

## 5.4 Results

### 5.4.1 Patients characteristics

The study comprised 99 patients who underwent carotid endarterectomy. Patients were predominantly male (64%) and hypertensive (89%) and had a mean age of  $67 \pm 9$  years. As expected, several patients also reported a history of concomitant coronary disease (18% had symptoms of stable angina and 10% reported a previous myocardial infarction). A history of a cerebral vascular attack was found in 27% of patients and a transient ischemic attack in 14%. Other clinical characteristics and comorbidities are described in Table 1. According to the independent neurologic clinical evaluation, 48% of patients were considered stable (36% were asymptomatic and 12% had experienced symptoms of ipsilateral ischemic stroke > 90 days before carotid endarterectomy), whereas 52% were considered unstable.

MRI identified 19% of patients with stenosis of 50% to 69%, 37% with 70% to 90% stenosis, and 43% with > 90% stenosis. In the T1W sequence, a hyperintense signal suggesting intraplaque hemorrhage (IPH) was identified in 67% of the patients. As previously described (32), neurological clinical status was highly associated with signs of IPH in the MRI ( $p < 0.001$ ). A hyperintense signal at MRI identified 90% (46 out of 51) of patients with recent neurological symptoms, while absence of a hyperintense signal identified 83% (39 out of 47) of subjects considered to be clinically stable (asymptomatic or remotely symptomatic).

#### **5.4.2 MMPs genotyping and serum levels of inflammatory biomarkers**

The distributions of genotypes were in Hardy-Weinberg equilibrium for all MMPs (data not shown). Genotype frequencies for MMP-1, MMP-3 and MMP-9 gene polymorphisms are depicted in Figure 2. Homozygosity for the 2G allele of the MMP-1 gene was present in 19% of the patients, for the 5A allele of the MMP-3 gene was present in 10%, and for the T allele of the MMP-9 gene was identified in 2% of the sample. The frequencies of minor alleles were 0.4 for MMP-1 -1607 1G, 0.47 for MMP-3 -1171 5A, and 0.16 for MMP-9 -1562 T. Table 2 describes the genotype frequencies according to several clinical characteristics of the studied population. MMPs genotypes were not associated with atherosclerotic risk factors, ischemic heart disease, revascularization procedures, previous neurological symptoms, MRI-based hyperintense signal or angiographic stenosis, and histology defined intraplaque hemorrhage (all p values > 0.05).

Table 3 describes the levels of different inflammatory biomarkers, including MMPs serum levels, according to MMPs genotypes. In general, we did not observe significant associations between MMPs genotypes and their respective serum levels, except for a higher serum concentration of MMP-3 in patients that were homozygous for the 5A allele of the MMP-3 gene. We also identified higher levels of PTX-3 and hs-CRP in patients carrying the 2G allele of the MMP-1 gene (responsible for an increased proteolytic activity in previous studies).

Histological data from the selected patients according to MMPs genotypes are described in Table 4. For these analyses we evaluated both the dominant and the recessive models to stratify by genotypes. Overall, we did not observe

significant interactions of MMPs genotypes and histological characteristics of the carotid atherosclerotic plaque, except for a counterintuitive lower fibrous cap thickness in patients that were homozygous for the 6A allele (MMP-3). Analysis for minimal or maximal fibrous cap thickness also did not identify significant associations.

#### **5.4.3 MMPs serum levels and vulnerability of carotid plaque**

We have detected strong and statistically significant correlation between MMP-9 serum levels and PTX-3 ( $r = 0.7$  and  $p < 0.001$ ), besides a weak to moderate association with hs-CRP ( $r = 0.34$  and  $p = 0.001$ ) (Figure 3). No association was observed among serum levels of MMP-1 and -3 and other biomarkers (all correlation coefficients  $< 0.25$ , data not shown). MMPs serum levels also did not correlate significantly among themselves.

Serum levels of MMP-9 were significantly increased in patients with a clinical history of previous active atherosclerotic disease, as well in patients with radiological and histological evidence of atherosclerotic vulnerability. Figure 4 demonstrates augmented MMP-9 levels in patients with previous stroke (4A), peripheral vascular disease (4B), acute or recent intraplaque hemorrhage on histology (4C), as well as according to fibrous cap thickness (4D). In particular, patients with a thinner fibrous cap (below the median) depicted higher levels of MMP-9 ( $395 \pm 251$  ng/mL versus  $156 \pm 78$  ng/mL, respectively;  $p = 0.033$ ). Similar differences were not observed in the analysis of serum levels of MMP-1 and MMP-3.

## 5.5. Discussion

The present study failed to demonstrate a meaningful association between MMPs genotypes and clinical, histological and MRI-based markers of atherosclerosis. However, MMPs serum levels, in particular, MMP-9 serum levels were significantly increased in patients with a clinical history of previous active atherosclerotic disease, as well as in patients with radiological and histological evidence of atherosclerotic vulnerability. We also have demonstrated that MMP-3 6A allele showed lower serum levels of MMP-3. Moreover, MMP-1 2G allele and MMP-9 serum levels were associated with higher serum levels of inflammatory markers, what it would be expected, since MMPs can be activated by cytokines and other inflammatory molecules (7)

MMP-3 is a key regulator of matrix remodeling, and in situations of atherosclerosis development in which extracellular matrix degradation is occurring, individuals who are genetically predisposed to produce more MMP-3 would have a greater ability to remodel and degrade the matrix components. *In vitro* and *in vivo* studies demonstrate that the 5A allele has higher promoter activity than the 6A allele. Thus, carriers of the 5A allele would be capable of producing more MMP-3 mRNA and hence would have a greater enzyme activity (12). Accordingly, we also demonstrated an association between the 5A allele and higher serum levels of MMP-3. Pöllänen *et al* (33) have demonstrated an interaction of higher promoter activity genotypes of MMP-3 and MMP-9 with areas of complicated lesions in the coronary artery. Nevertheless, some studies have shown that the 6A allele is associated with carotid stenosis and increased intima-media thickness and paradoxically higher levels of active MMP-3 in the

blood (13-17). In this study, we found a counterintuitive thinner fibrous cap thickness in patients that were homozygous for the 6A allele, since subjects carrying the 6A allele tend to accumulate extracellular matrix because of decreased degradation. Additionally, we observed that the 2G allele (MMP-1) was more frequent in patients with previous stroke and peripheral artery disease, suggesting a trend towards an association between this genotype and clinical events. On the other hand, Fiotti *et al* (18) showed an association of 2G allele with smaller plaques and thicker fibrous cap, as well as with better prognosis in acute vascular events.

We did not identify a significant association of total MMP-1 and 9 serum levels and their respective genotypes. This lack of association may be explained in part by the small sample size and the high variability in the MMPs serum levels among patients. Previous studies also have failed to demonstrate a significant correlation between genotypes and serum levels of MMP-1 and -9 (15-17). However, other researchers showed, in patients with coronary artery disease, that the T allele is associated with higher levels of MMP-9 (33, 34).

A growing number of new inflammatory biomarkers of atherosclerosis has been identified in the past few years, including hs-CRP and PTX-3. The present study suggests that MMPs might constitute a novel biomarker for characterizing vulnerability of carotid plaque, especially MMP-9. Several of these enzymes are overexpressed in the shoulder regions of atherosclerotic plaques and participate in the processes that lead to plaque destabilization, particularly by degrading the fibrous cap (10, 11). We have shown that higher MMP-9 levels correlated with acute or recent intraplaque hemorrhage and with



a thinner fibrous cap thickness on histology. Choudhary *et al* (35) demonstrated that spatial distribution of MMP-9 levels and activity in carotid atherosclerotic lesions are highly heterogeneous, reflecting lesion location, size and composition. Furthermore, Heo *et al* (36) showed a significant correlation between increased MMP-9 expression and fibrous cap rupture and large lipid core.

In addition, we observed augmented MMP-9 levels in patients with previous stroke and peripheral vascular disease. In fact, previous studies demonstrated an association between MMP-9 levels and clinical events. Ding *et al* (37) identified higher serum levels of MMP-9 in patients with stroke than in asymptomatic patients. Other studies demonstrated that MMP-9 levels are higher in patients with carotid stenosis, cerebral lesion, embolic stroke and lethal cardiovascular events (8, 34, 38). Nevertheless, Baroncini *et al* (39) using specimens of carotid plaques and normal tissue, observed that MMP-9 protein levels were significantly higher in asymptomatic patients and controls than in symptomatic patients.

Some limitations related to our study design and analyses must be considered. We failed to demonstrate the association of genotypes with serum levels of MMPs, probably because we measured the total levels but no active form of MMPs. So, additional research is necessary to verify the real association between genotypes and activity of MMPs. In addition, histopathological analyses were carried out in a selected group of patients (n = 15) with genotypes that were expected to represent patients with the highest and lowest MMPs activity. This approach might have underpowered our findings.

Our results demonstrate that polymorphisms in MMP-3 and MMP-1 genes were associated with MMP-3 and inflammatory biomarkers serum levels, respectively. In addition, serum levels of MMP-9 were significantly increased in patients with a clinical history of previous active atherosclerotic disease, as well as in patients with radiological and histological evidence of atherosclerotic susceptibility. Therefore, our findings suggest that the MMPs are involved in the process of vulnerability of the carotid atherosclerotic plaque, as well as with clinical characteristics.

## 5.6. References

1. Golledge J, Siew DA. Identifying the carotid 'high risk' plaque: is it still a riddle wrapped up in an enigma? *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2008; 35: 2-8.
2. Goldstein LB, Adams R, Alberts MJ, Appel LJ, Brass LM, Bushnell CD, Culebras A, DeGraba TJ, Gorelick PB, Guyton JR, Hart RG, Howard G, Kelly-Hayes M, Nixon JV, Sacco RL. Primary prevention of ischemic stroke: a guideline from the American Heart Association/American Stroke Association Stroke Council. *Stroke* 2006; 37: 577-617.
3. Executive Committee for the Asymptomatic Carotid Atherosclerosis Study. Endarterectomy for asymptomatic carotid artery stenosis. *JAMA* 1995; 273: 1421-1428.
4. Randomised trial of endarterectomy for recently symptomatic carotid stenosis: final results of the MRC European Carotid Surgery Trial (ECST). *Lancet* 1998; 351: 1379-1387.
5. Shah PK. Plaque disruption and thrombosis: potential role of inflammation and infection. *Cardiol Rev* 2000; 8: 31-39.
6. Verhoeven B, Hellings WE, Moll FL, de Vries JP, de Kleijn DPV, de Bruin P. Carotid atherosclerotic plaques in patients with transient attacks and stroke have unstable characteristics compared with plaques in asymptomatic and amaurosis fugax patients. *J Vasc Surg* 2005; 42: 1077-1081.
7. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* 2011; 473: 317-325.

8. Taurino M, Raffa S, Mastroddi M, Visco V, Rizzo L, Torrisi MR, Faraglia V. Metalloproteinases expression in carotid plaque and its correlation with plasma levels before and after carotid endarterectomy. *Vasc Endovascular Surg* 2008; 41: 516-521.
9. Loftus IM, Naylor AR, Goodall S, Crowther M, Jones L, Bell PR, Thompson MM. Increased matrix metalloproteinase-9 activity in unstable carotid plaques. A potential role in acute plaque disruption. *Stroke* 2000; 31: 40-47.
10. Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 1994; 94: 2493-2503.
11. Sukhova GK, Schonbeck U, Rabkin E, Schoen FJ, Poole AR, Billingham RC, Libby P. Evidence for increased collagenolysis by interstitial collagenases-1 and -3 in vulnerable human atheromatous plaques. *Circulation* 1999; 99: 2503-2509.
12. Ye S, Watts GF, Mandalia S, Humphries SE, Henney AM. Preliminary report: genetic variation in the human stromelysin promoter is associated with progression of coronary atherosclerosis. *Br Heart J* 1995; 73: 209–215.
13. Djuric T, Živković M, Radak D, Jekić D, Radak S, Stojković L, Raičević R, Stanković A, Alavantić D. Association of MMP-3 5A/6A gene polymorphism with susceptibility to carotid atherosclerosis. *Clin Biochem* 2008; 41: 1326–1329.
14. Ghilardi G, Biondi ML, DeMonti M, Turri O, Guagnellini E, Scorza R. Matrix metalloproteinase-1 and matrix metalloproteinase-3 gene promoter

- polymorphisms are associated with carotid artery stenosis. *Stroke* 2002; 33: 2408–2412.
15. Gnasso A, Motti C, Irace C, Carallo C, Liberatoscioli L, Bernardini S, Massoud R, Mattioli PL, Federici G, Cortese C. Genetic variation in human stromelysin gene promoter and common carotid geometry in healthy male subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20: 1600–1605.
  16. Lien LM, Hsieh YC, Bai CH, Chen WH, Chiu HC, Hsieh FI, Shyu KG, Chiou HY, Hsu CY. Association of blood active matrix metalloproteinase-3 with carotid plaque score from a community population in Taiwan. *Atherosclerosis* 2010; 212: 595–600.
  17. Rauramaa R, Vaisanen SB, Luong LA, Schmidt-Trucksass A, Penttila IM, Bouchard C, Töyry J, Humphries SE. Stromelysin-1 and interleukin-6 gene promoter polymorphisms are determinants of asymptomatic carotid artery atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 2657–2662.
  18. Fiotti N, Moretti ME, Bussani R, Altamura N, Zamolo F, Gerloni R, Ukovich L, Ober E, Silvestri F, Grassi G, Adovasio R, Giansante C. Features of vulnerable plaques and clinical outcome of UA/NSTEMI. Relationship with matrix metalloproteinase functional polymorphisms. *Atherosclerosis* 2010; doi:10.1016/j.atherosclerosis.2010.12.010.
  19. Pöllänen PJ, Karhunen PJ, Mikkelsen J, Laippala P, Perola M, Penttilä A, Mattila KM, Koivula T, Lehtimäki T. Coronary artery complicated lesion area is related to functional polymorphisms of matrix metalloproteinase 9 gene: an autopsy study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 1446–1450.

20. Barnett HJM, Taylor DW, Eliasziw M, Fox AJ, Ferguson GG, Haynes RB, Rankin RN, Clagett GP, Hachinski VC, Sackett DL, Thorpe KE, Meldrum HE, Spence JD. Benefit of carotid endarterectomy in patients with symptomatic moderate or severe stenosis. North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial Collaborators. *N Engl J Med* 1998; 339: 1415-1425.
21. MRC Asymptomatic Carotid Surgery Trial (ACST) Collaborative Group. Prevention of disabling and fatal strokes by successful carotid endarterectomy in patients without recent neurological symptoms: randomized controlled trial. *Lancet* 2004; 363: 1491-1502.
22. Moody AR, Murphy RE, Morgan PS, Martel AL, Delay GS, Allder S, MacSweeney ST, Tennant WG, Gladman J, Lowe J, Hunt BJ. Characterization of complicated carotid plaque with magnetic resonance: direct thrombus imaging in patients with cerebral ischemia. *Circulation* 2003; 107: 3047-3052.
23. North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial Collaborators. Beneficial effect of carotid endarterectomy in symptomatic patients with high-grade carotid stenosis. *N Engl J Med* 1991; 325: 445-453.
24. Nederkoorn PJ, van der Graaf Y, Hunink MG. Duplex ultrasound and magnetic resonance angiography compared with digital subtraction angiography in carotid artery stenosis: a systematic review. *Stroke* 2003; 34: 1324-1332.

25. Lahiri DK, Nurnberger JI. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 1991; 19: 5444.
26. Dunleavey L, Beyzade S, Ye S. Rapid genotype analysis of the matrix metalloproteinase-1 gene 1G/2G polymorphism that is associated with risk of cancer. *Matrix Biol* 2000; 19: 175-177.
27. Dunleavey L, Beyzade S, Ye S. Rapid genotype analysis of the stromelysin gene 5A/6A polymorphism. *Atherosclerosis* 2000; 151: 587-589.
28. Zhang B, Ye S, Herrmann SM, Eriksson P, De Maat M, Evans A, et al. Functional polymorphism in the regulatory region of gelatinase B gene in relation to severity of coronary atherosclerosis. *Circulation* 1999; 99: 1788-1794.
29. Vercelino R, Crespo I, de Souza GFP, Cuevas MJ, de Oliveira MG, Marroni NP, Gonzales-Gallego J, Tuñón MJ. S-nitroso-N-acetylcysteine attenuates liver fibrosis in cirrhotic rats. *J Mol Med* 2010 88: 401–411.
30. Devuyst G, Ruchat P, Karapanayiotides T, Jonasson L, Cuisinaire O, Lobrinus J-A, Pusztaszeri M, Kalangos A, Despland P-A, Thiran J-P, Bogousslavsky. Ultrasound measurement of the fibrous cap in symptomatic and asymptomatic atheromatous carotid plaques. *Circulation* 2005; 111: 2776-2782.
31. Lusby RJ, Ferrel LD, Ehrenfeld WK, Stoney RJ, Wylie EJ. Carotid plaque hemorrhage. Its role in production of cerebral ischemia. *Arch Surg* 1982; 117: 1479-1488.

32. Albuquerque LC, Narvaes LB, Maciel AA, Staub H, Friedrich M, Hoefel Filho JR, Marques MB, Rohde LE. Intraplaque hemorrhage assessed by high-resolution magnetic resonance and C-reactive protein in carotid atherosclerosis. *J Vasc Surg* 2007; 46: 1130-1137.
33. Pöllänen PJ, Lehtimäki T, Mikkelsson J, Ilveskoski E, Kunnas T, Perola M, Penttilä A, Mattila KM, Nikkari ST, Syrjäkoski K, Karhunen PJ. Matrix metalloproteinase 3 and 9 gene promoter polymorphisms: joint action of two loci as a risk factor for coronary artery complicated plaques. *Atherosclerosis* 2005; 180: 73-79.
34. Blankenberg S, Rupprecht HJ, Poirier O, Bickel C, Smieja M, Hafner G, Meyer J, Cambien F, Tiret L. Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase 9 and prognosis of patients with cardiovascular disease. *Circulation* 2003; 107: 1579-1585.
35. Choudhary S, Higgins CL, Chen IY, Reardon M, Lawrie G, Vick GW, Karmonik C, Via DP, Morrisett JD. Quantitation and localization of matrix metalloproinsases and their inhibitor in human carotid endartectomy tissues. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 2351-2358.
36. Heo SH, Cho CH, Kim HO, Jo YH, Yoon KS, Lee JH, Park JC, Park KC, Ahn TB, Chung KC, Yoon SS, Chang DII. Plaque rupture is a determinant of vascular events in carotid artery atherosclerotic disease: Involvement of matrix metalloproteinases 2 and 9. *J Clin Neurol* 2011; 7: 69-76.
37. Ding S, Zhang M, Zhao Y, Chen W, Yao G, Zhang C, Zhang P, Zhang Y. The role of carotid plaque vulnerability and inflammation in the pathogenesis of acute ischemic stroke. *Am J Med Sci* 2008; 336: 27-31.



38. Kunte H, Kunte G, Busch MA, Weichert W, Rückert RI, Harms L. Differences in carotid plaque content of macrophages, T cells and MMP-9 between patients with embolic and hemodynamic cerebral ischemia due to symptomatic carotid stenosis. *Atherosclerosis*. 2010; 211: 456-460.
39. Barocini LA, Nakao LS, Ramos SG, Pazin A, Murta LO, Inberman M, Tefé-Silva C, Précoma DB. Assessment of MMP-9, TIMP-1, and COX-2 in normal tissue and in advanced symptomatic and asymptomatic carotid plaques. *Thromb J*. 2011; 9: 1-6.

**Table 2. Clinical characteristics of the studied population**

<b>Characteristics</b>	<b>All, n = 99</b>
<b>Age, years</b>	67 ± 9
<b>Male gender, n (%)</b>	63 (63.6)
<b>Active smoking, n (%)</b>	21 (21.2)
<b>Hypertension, n (%)</b>	88 (88.9)
<b>Diabetes, n (%)</b>	30 (30.3)
<b>Obesity, n (%)</b>	23 (23.2)
<b>Previous stable angina, n (%)</b>	18 (18.2)
<b>Previous myocardial infarction, n (%)</b>	10 (10.1)
<b>Previous CABG, n (%)</b>	15 (15.1)
<b>Peripheral artery disease, n (%)</b>	34 (34.3)
<b>Cerebral vascular attack, n (%)</b>	27 (27.3)
<b>Transient ischemic attack, n (%)</b>	14 (14.1)
<b>Atrial fibrillation, n (%)</b>	3 (3.0)
<b>Systolic blood pressure, mmHg</b>	132 ± 16
<b>Diastolic blood pressure, mmHg</b>	79 ± 10
<b>Total cholesterol, mg/dL</b>	170 ± 46
<b>HDL cholesterol, mg/dL</b>	41 ± 12
<b>LDL cholesterol, mg/dL</b>	100 ± 43
<b>Triglycerides, mg/dL</b>	167 ± 94
<b>Statin therapy, n (%)</b>	88 (88.9)
<b>Antiplatelet agents, n (%)</b>	68 (68.7)

CABG – coronary artery bypass graft; LDL – low-density lipoprotein; HDL – high-density lipoprotein.

**Table 3. Clinical characteristics according to MMPs genotypes**

	<b>MMP-1 Genotype</b>			<b>MMP-3 Genotype</b>			<b>MMP-9 Genotype</b>		
	<b>2G2G/1G2G</b> n=80	<b>1G1G</b> n=19	<b>p</b>	<b>5A5A</b> n=10	<b>6A6A/6A6A</b> n=89	<b>p</b>	<b>TT/CT</b> n=28	<b>CC</b> n=68	<b>p</b>
<b>Hypertension, n (%)</b>	71 (88.8)	16 (84.2)	0.69	10 (100)	77 (86.5)	0.60	25 (89.3)	59 (86.8)	>0.99
<b>Hypercholesterolemia, n (%)</b>	35 (43.8)	9 (47.4)	0.97	6 (60.0)	38 (42.7)	0.33	14 (50.0)	29 (42.6)	0.66
<b>Previous MI, n (%)</b>	10 (12.5)	-	0.21	2 (20.0)	8 (9.0)	0.26	5 (17.9)	5 (7.4)	0.15
<b>Previous CABG, n (%)</b>	12 (15.0)	3 (15.8)	>0.99	1 (10.0)	14 (15.7)	>0.99	5 (17.9)	10 (14.7)	0.76
<b>Stable angina, n (%)</b>	16 (20.0)	2 (10.5)	0.51	-	18 (20.2)	0.21	3 (10.7)	14 (20.6)	0.37
<b>Atrial fibrillation, n (%)</b>	3 (3.8)	-	>0.99	-	3 (3.4)	>0.99	1 (3.6)	2 (2.9)	>0.99
<b>Peripheral artery disease, n (%)</b>	31 (38.8)	3 (15.8)	0.06	2 (20.0)	32 (36.0)	0.48	9 (32.1)	25 (36.8)	0.84
<b>Previous TIA, n (%)</b>	11 (13.8)	3 (15.8)	0.72	1 (10.0)	13 (14.6)	>0.99	5 (17.9)	7 (10.3)	0.32
<b>Previous stroke, n (%)</b>	25 (31.3)	2 (10.5)	0.08	4 (40.0)	23 (25.8)	0.45	8 (28.6)	19 (27.9)	>0.99
<b>Symptomatic, n (%)</b>	42 (52.5)	10 (52.6)	>0.99	4 (40.0)	48 (53.9)	0.51	15 (53.6)	34 (50.0)	0.92
<b>MRI</b>									
<b>Hyperintense signal, n (%)</b>	45 (56.3)	9 (47.4)	0.65	5 (50.0)	49 (55.1)	>0.99	17 (60.7)	35 (51.5)	0.54
<b>Stenosis &gt; 70%, n (%)</b>	66 (82.5)	14 (73.7)	0.51	9 (90.0)	71 (79.8)	0.68	23 (80.2)	54 (79.4)	0.98
<b>Histology</b>									
<b>IP hemorrhage, n (%)</b>	48 (60.0)	11 (57.9)	>0.99	7 (70.0)	52 (58.4)	0.73	19 (67.9)	38 (55.9)	0.39

MI – myocardial infarction; CABG – coronary artery bypass graft; TIA – transient ischemic attack; MRI – magnetic resonance imaging; IP– intraplaque.

**Table 4. Serum levels of MMPs and inflammatory markers of plaque vulnerability according to MMPs genotypes**

	<u>MMP-1 Genotype</u>			<u>MMP-3 Genotype</u>			<u>MMP-9 Genotype</u>		
	<b>2G2G/1G2G</b>	<b>1G1G</b>	<b><i>p</i></b>	<b>5A5A</b>	<b>6A6A/6A6A</b>	<b><i>p</i></b>	<b>TT/CT</b>	<b>CC</b>	<b><i>p</i></b>
<b>MMP-1 (ng/mL)</b>	4.9 ± 5.6	5.4 ± 5.3	0.59	5.9 ± 4.3	4.9 ± 5.5	0.54	5.5 ± 5.0	5.0 ± 5.8	0.54
<b>MMP-3 (ng/mL)</b>	10.1 ± 9.0	12.5 ± 11.2	0.31	15.9 ± 10.6	9.8 ± 9.1	0.016	13.6 ± 13.5	9.3 ± 7.2	0.33
<b>MMP-9 (ng/mL)</b>	305 ± 217	228 ± 205	0.20	328 ± 233	258 ± 214	0.57	282 ± 216	297 ± 210	0.79
<b>PTX-3 (ng/mL)</b>	6.7 ± 4.9	4.3 ± 2.6	0.01	5.2 ± 2.2	6.3 ± 4.8	0.74	6.9 ± 6.7	5.9 ± 3.6	0.56
<b>hs-CRP (mg/dL)</b>	1.0 ± 1.9	0.6 ± 1.5	0.02	1.0 ± 1.2	0.9 ± 1.9	0.92	1.0 ± 1.7	0.9 ± 2.0	0.66

Variables are presented as mean ± SD. Statistical analysis was based on log hs-CRP, log MMP-1, square root MMP-3, log PTX-3 and non-transformed MMP-9.

MMP – matrix metalloproteinase; PTX-3 – pentraxin 3; hs-CRP – high-sensitivity C-reactive protein.

Table 4. Histological analysis and MMPs genotypes

	Colagen Content (%)	Lipid Core (%)	Fibrous Cap Thickness ( $\mu\text{m}$ )	IP Hemorrhage n (%)
<b>MMP-1 Genotype</b>				
<b>Dominant model</b>				
2G2G/1G2G	40 $\pm$ 17	35 $\pm$ 21	376 $\pm$ 204	48 (60.0)
1G1G	53 $\pm$ 16	24 $\pm$ 22	419 $\pm$ 223	11 (57.9)
	<i>p</i> =0.14	<i>p</i> =0.35	<i>p</i> =0.71	<i>p</i> >0.99
<b>Recessive model</b>				
1G1G/1G2G	46 $\pm$ 19	31 $\pm$ 25	346 $\pm$ 208	43 (58.9)
2G2G	43 $\pm$ 18	32 $\pm$ 17	465 $\pm$ 195	16 (61.5)
	<i>p</i> =0.77	<i>p</i> =0.94	<i>p</i> =0.28	<i>p</i> =0.99
<b>MMP-3 Genotype</b>				
<b>Dominant model</b>				
5A5A/5A6A	47 $\pm$ 16	32 $\pm$ 23	673 $\pm$ 247	41 (59.4)
6A6A	44 $\pm$ 20	31 $\pm$ 22	427 $\pm$ 149	18 (60.0)
	<i>p</i> =0.77	<i>p</i> =0.94	<i>p</i> =0.04	<i>p</i> >0.99
<b>Recessive model</b>				
5A6A/6A6A	46 $\pm$ 18	29 $\pm$ 21	539 $\pm$ 249	52 (58.4)
5A5A	38 $\pm$ 23	42 $\pm$ 24	557 $\pm$ 41	7 (70.0)
	<i>p</i> =0.55	<i>p</i> =0.45	<i>p</i> =0.81	<i>p</i> =0.73
<b>MMP-9 Genotype</b>				
<b>Dominant model</b>				
TT/CT	41 $\pm$ 17	39 $\pm$ 19	395 $\pm$ 210	19 (67.9)
CC	49 $\pm$ 19	21 $\pm$ 21	392 $\pm$ 216	38 (55.9)
	<i>p</i> =0.42	<i>p</i> =0.12	<i>p</i> =0.98	<i>p</i> =0.39
<b>Recessive model</b>				
CC/CT	46 $\pm$ 18	27 $\pm$ 20	419 $\pm$ 208	56 (59.6)
TT	40 $\pm$ 19	54 $\pm$ 10	225 $\pm$ 67	1 (50.0)
	<i>p</i> =0.68	<i>p</i> =0.10	<i>p</i> =0.22	<i>p</i> >0.99

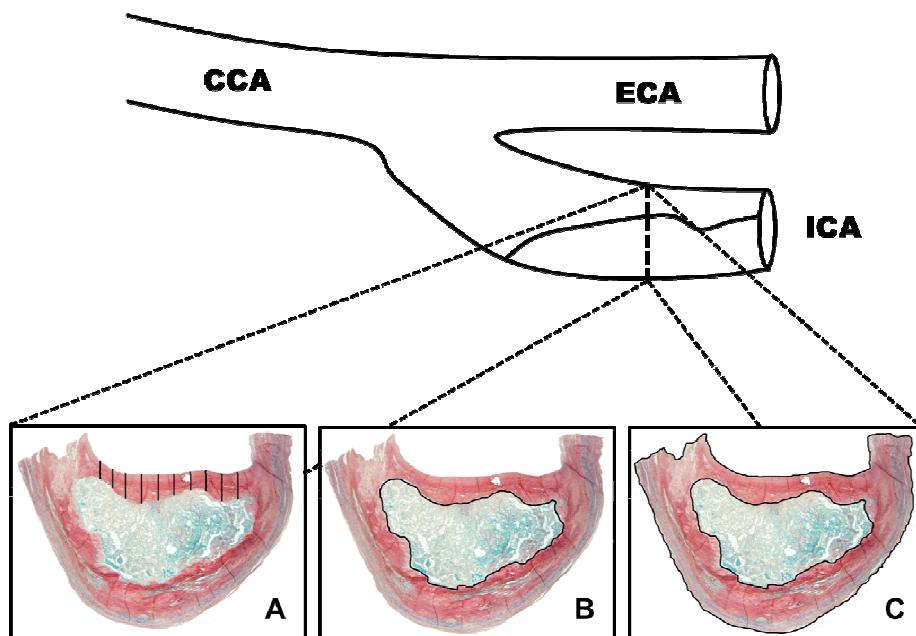
IP – intraplaque

**Supplementary Table 1. Demographic, clinical and genetic characteristics of patients who were studied in histology**

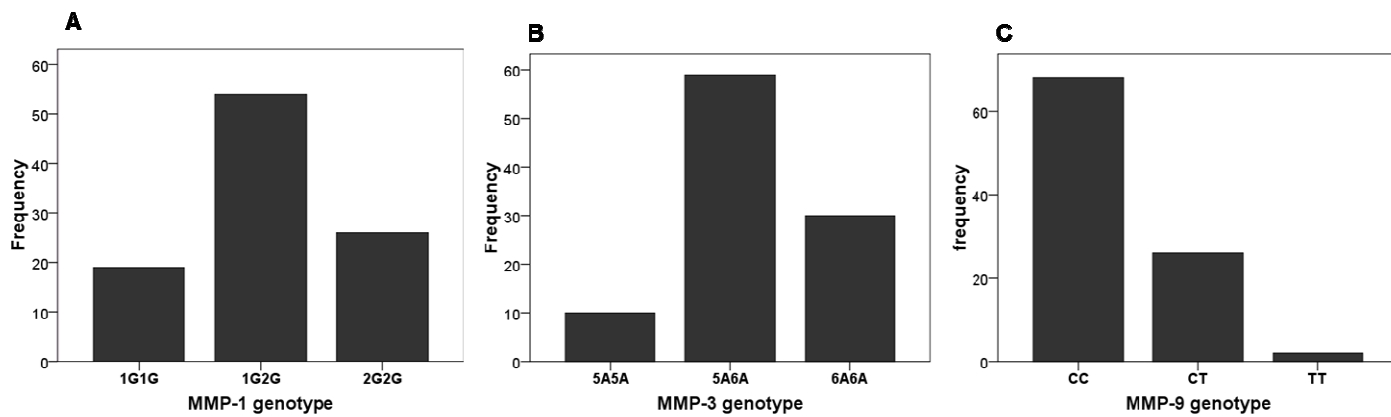
<b>Patients</b>	<b>Age, years</b>	<b>Gender</b>	<b>Neurological Classification</b>	<b>Stenosis (%)</b>	<b>Risk Alleles* (n)</b>	<b>MMP-1 Genotype</b>	<b>MMP-3 Genotype</b>	<b>MMP-9 Genotype</b>
1	77	M	Symptomatic	50 – 60	0	1G1G	6A6A	CC
2	85	F	Symptomatic	>90	0	1G1G	6A6A	CC
3	62	F	Symptomatic	>90	1	1G1G	5A6A	CC
4	70	F	Symptomatic	70-90	1	1G1G	5A6A	CC
5	60	M	Symptomatic	>90	1	1G2G	6A6A	CC
6	73	M	Symptomatic	>90	1	1G1G	5A6A	CC
7	60	M	Asymptomatic	>90	1	1G1G	5A6A	CC
8	54	M	Asymptomatic	>90	3	1G2G	6A6A	TT
9	71	M	Symptomatic	>90	3	2G2G	6A6A	CT
10	67	M	Symptomatic	>90	3	2G2G	6A6A	CT
11	52	F	Asymptomatic	>90	3	2G2G	6A6A	CT
12	65	M	Symptomatic	70-90	4	2G2G	5A6A	CT
13	63	M	Symptomatic	70-90	4	1G2G	5A5A	CT
14	66	M	Asymptomatic	70-90	4	2G2G	6A6A	TT
15	71	M	Symptomatic	>90	5	2G2G	5A5A	CT

M – male, F - female

\*Risk alleles comprise the 2G (MMP-1), 5A (MMP-3) and T (MMP-9) alleles.

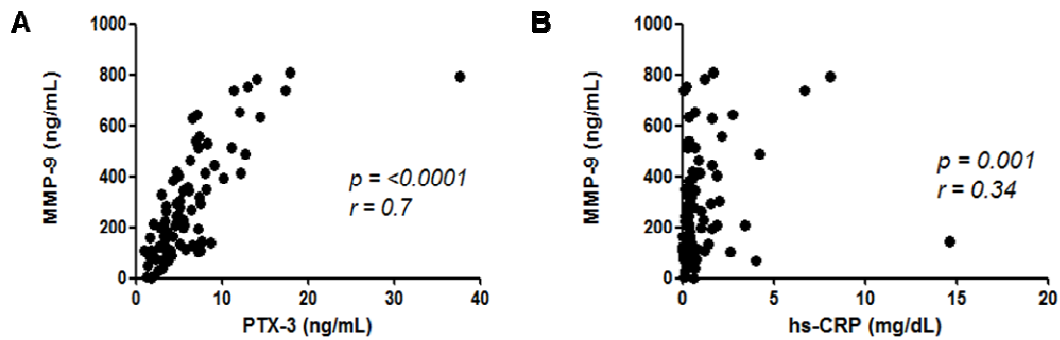


**Figure 1.** Representative image of methods used in the histopathologic analyses. A, fibrous cap thickness. B, size of lipid core. C, percentage of collagen.

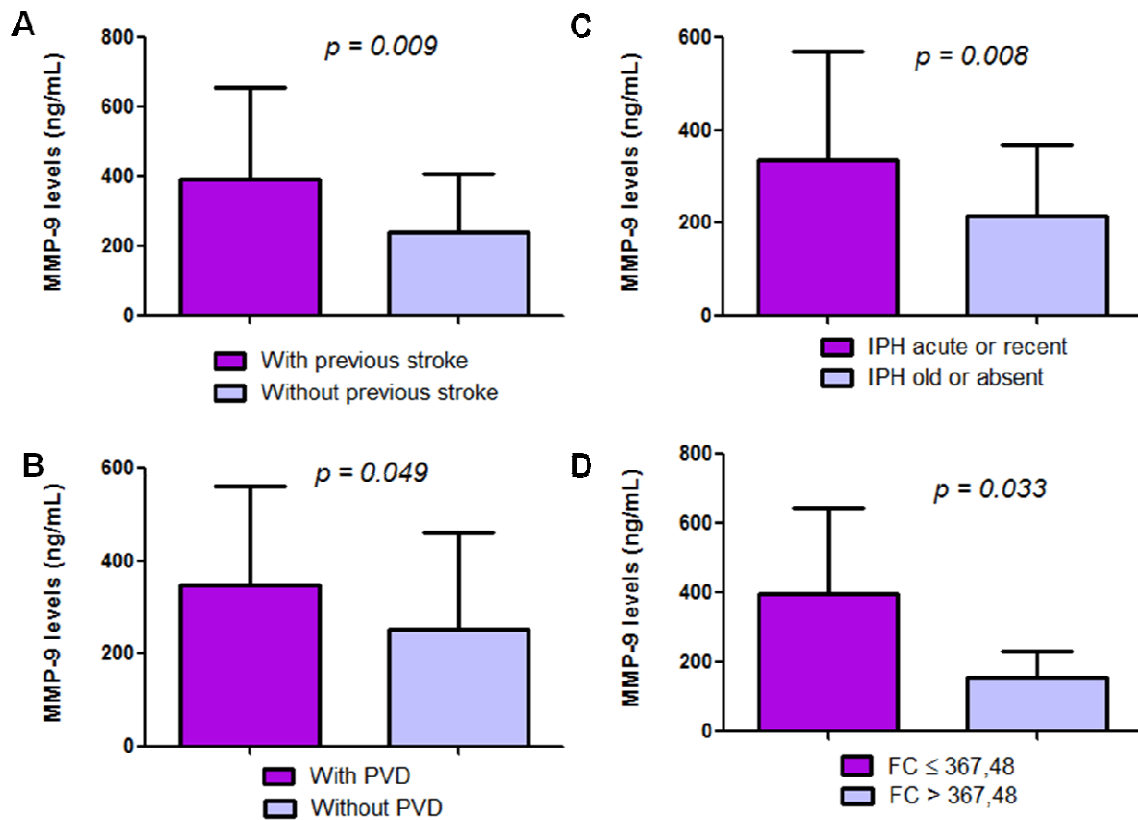


**Figure 2.** Genotype frequencies of MMPs gene polymorphisms in study patients





**Figure 3.** Correlations of MMP-9 serum levels with inflammatory markers. A, Correlation between MMP-9 and PTX-3. B, Correlation between MMP-9 and hs-CRP.



**Figure 4.** MMP-9 serum levels and clinical and histological markers of atherosclerosis vulnerability. FC – Fibrous cap, IPH – intraplaque hemorrhage, PVD - Peripheral vascular disease.

## 6 ANEXOS

### 6.1 Termo de consentimento livre e esclarecido

#### CORRELAÇÃO ENTRE METALOPROTEINASES DE MATRIZ EXTRACELULAR E HEMORRAGIA INTRAPLACA NA ATEROSCLEROSE CAROTÍDEA

##### 1. Justificativa e objetivos da pesquisa:

A circulação e o suprimento sanguíneo do cérebro se dá principalmente pelas artérias carótidas, que estão situadas no pescoço. Na doença obstrutiva de artérias carótidas, ocorre a presença de placas de gordura (ateromas), determinando um entupimento progressivo da passagem do sangue, e que se não tratadas podem causar derrame cerebral. No caso de obstruções graves, a melhor opção de tratamento para evitar-se o derrame é a cirurgia, denominada de endarterectomia de carótida, a qual é atualmente indicada com base exclusivamente no percentual de estreitamento. No entanto, há um componente de inflamação que contribui para tornar estas placas instáveis, isto é, com maior tendência a provocar derrame. Essa inflamação pode ser medida através de substâncias encontradas no sangue. O objetivo deste trabalho é verificar se a presença destas substâncias inflamatórias realmente está associada à instabilidade da placa de ateroma e risco aumentado de derrame cerebral.

##### 2. Os procedimentos a serem realizados:

Todos os pacientes com obstrução das carótidas e indicação de endarterectomia de carótida serão submetidos a uma Ressonância Magnética da região cervical, mais especificamente das artérias carótidas, para determinar as características da placa de ateroma. Para verificarmos a presença de substâncias marcadoras de inflamação, serão coletados 20 mL de sangue de uma veia do braço, no momento da cirurgia, no bloco

cirúrgico. A placa removida da artéria será submetida à análise microscópica de suas características.

### 3. Os desconfortos ou riscos esperados:

Poderá ocorrer desconforto ou fobia (medo) durante a Ressonância Magnética. Se isso ocorrer, o exame será interrompido imediatamente.

Há um risco remoto (menor que 1%) de reações alérgicas ao contraste utilizado no exame.

A coleta de sangue do braço pode ocasionar dor local, o que não seria evitado sem este estudo, pois a punção é essencial à anestesia para o procedimento cirúrgico.

Não há aumento no risco de complicações pós-operatórias ou mesmo óbito, devido ao estudo.

### 4. Os benefícios que o estudo pode trazer:

A confirmação da hipótese da pesquisa contribuirá futuramente para a detecção e o tratamento precoce dos casos de obstrução carotídea com maior risco de derrame cerebral.

### 5. Direitos do paciente:

- a- Garantia de resposta a qualquer pergunta;
- b- Liberdade para abandonar a pesquisa sem prejuízo para si;
- c- Disponibilidade de tratamento médico e indenização em caso de danos;
- d- Garantia de privacidade.

### 6. Atribuições do pesquisador:

- a- Compromisso com informação atualizada do estudo;

b- Garantia de que custos adicionais serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

Eu, ..... (nome do paciente ou responsável) fui informado dos objetivos da pesquisa acima, de maneira clara e detalhada. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão se assim eu desejar. A Dra. Luciane Barreneche Narvaes (pesquisadora responsável) certificou-me de que todos os dados desta pesquisa referentes ao paciente serão confidenciais e terei liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa.

Fui informado de que caso existirem danos a minha saúde, causados diretamente pela pesquisa, terei direito a tratamento médico e indenização conforme estabelece a lei. Também sei que caso existam gastos adicionais, estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa. Caso tiver novas perguntas sobre este estudo, posso chamar a Dra. Luciane Barreneche Narvaes (pesquisadora responsável) no telefone (0XX51-33368190).

_____	_____	_____
Assinatura do paciente	Nome do paciente	Data

_____	_____	_____
Assinatura da pesquisadora	Nome da pesquisadora	Data

Este formulário foi lido para ..... (nome do paciente) em ..... (data) pela ..... (nome da pesquisadora), enquanto eu estava presente.

_____	_____	_____
Assinatura da testemunha	Nome da testemunha	Data

**6.2 Ficha de avaliação clínica**

N°

Nome: \_\_\_\_\_ Prontuário: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Telefone(s): \_\_\_\_\_

Data Internação: \_\_\_\_\_ Data Cirurgia: \_\_\_\_\_ Data Alta: \_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_ Sexo: (1) Masculino (2) Feminino

Fatores de Risco Cardiovascular:

Tabagismo: (1) Ativo (2) Passado (3) Nunca fumou

(4) HAS (5) DM (6) Hxt Familiar Positiva (7) Obesidade (8) Sedentarismo

História Cardíaca:

(1) Angina estável (2) IAM prévio-Data: \_\_\_\_\_

(3) Cateterismo-Data: \_\_\_\_\_ (4) ACTP-Data: \_\_\_\_\_

(5) CRM-Data: \_\_\_\_\_ (6) FA paroxística (7) FA crônica

História Neurológica:

(9) AIT(s) prévio(s)-Data(s): \_\_\_\_\_

(10) AVC(s) prévio(s)-Data(s): \_\_\_\_\_

História Médica Pgressa:

(1) Doença vascular periférica (5) Doença hepática (9) Doença cerebrovascular (13) Demência

(2) Doença do tecido conjuntivo (6) D. hepática (10) Úlcera gástrica

(3) DM c/ lesão órgão alvo (7) D. renal (11) DPOC

(4) Tumor metastático (8) Neoplasia (12) AIDS

Fármacos na Admissão (nome, doses mg/dia):

(1) AAS/ Clopidogrel/ Ticlopidina (2) Estatina (3) Beta-bloqueador (4) Nitrato (5) IECA

(6) Diurético (7) Insulina/Hipoglicemiante oral (8) Bloq. Canais Cálcio (9) Anticoagulante

(10) Digoxina (11) Outros

Exame Físico:

PA 1= \_\_\_\_ / \_\_\_\_ mmHg PA2= \_\_\_\_ / \_\_\_\_ FC= \_\_\_\_ bpm

Peso= \_\_\_\_ Kg Altura= \_\_\_\_ cm

### 6.3 Ficha de avaliação neurológica

Nº

1. Assintomático

2. Sintomático Estável (sem sintomas há mais de 3 meses)

AVE menor

AIT

3. Sintomático Instável (com sintomas há menos de 3 meses)

AVE menor

AIT pós-AVE

AITs recorrentes

**6.4 Ficha laboratorial**

N°

1. Creatinina \_\_\_\_\_
2. Hemograma  
Hematócrito \_\_\_\_\_ Leucócitos \_\_\_\_\_
3. Perfil Lipídico  
CTotal \_\_\_\_\_ CLDL \_\_\_\_\_ CHDL \_\_\_\_\_ TG \_\_\_\_\_
4. Glicemia Jejum \_\_\_\_\_
5. PCR US \_\_\_\_\_

## 6.5 Ficha angiográfica

N°
----

Grau de estenose:

1. Estenose entre 50 e 69%
2. Estenose entre 70 e 90%
3. Estenose acima de 90%

Sinal hiperintenso:

1. Sim
2. Não



## 6.6 Ficha histológica

N°

HEMORRAGIA INTRAPLACA:

1. Aguda
2. Recente
3. Antiga
4. Ausente