

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

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

AUTORA: Luciane Barreneche Narvaes

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Porto Alegre, 2008

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

AUTORA: Luciane Barreneche Narvaes

*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, 2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Ficha Catalográfica será preenchida após Defesa

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Pesquisa Cardiovascular do Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre / 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 ESPECIAIS**

Ao Prof. Dr. Luis Eduardo Rohde, pelos ensinamentos, dedicação, paciência e, principalmente, pela especial oportunidade de realizar este estudo.

À Profa. Dra. Kátia Gonçalves dos Santos, pelas palavras de incentivo e fundamental ajuda na elaboração deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Luciano Cabral Albuquerque, pelo estímulo, apoio e amizade durante os anos de convivência.

Ao Prof. Dr. Marco Antonio Goldani, Chefe do Serviço de Cirurgia Cardiovascular da PUCRS, pela confiança, amizade e apoio fundamentais para o desenvolvimento deste estudo.

Às minhas amigas, que enriquecem minha vida e são fonte inesgotável de alegria e carinho.

À minha mãe, pelo afeto e apoio incondicional.

Ao meu pai, pelas lembranças de amor que nunca se apagarão.

## AGRADECIMENTOS

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

Ao Prof. Dr. João Rubião Hoefel Filho, pela dedicada colaboração na interpretação das imagens de ressonância nuclear magnética.

À Daiane Silvello, pesquisadora do Laboratório de Pesquisa Cardiovascular do Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pela competente colaboração para as dosagens das metaloproteínas de matriz e ajuda na organização do banco de dados e realização das análises estatísticas.

Ao colega Dr. Roberto Salvaro, pela disponibilidade e contribuição na realização das análises estatísticas deste trabalho.

Aos colegas do Serviço de Cirurgia Cardiovascular do Hospital São Lucas da PUCRS, pelo apoio e compreensão nos momentos de ausência para dedicação a este estudo.

À Flávia Rejane Giusti Grossmann, funcionária do Laboratório de Patologia do Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pela colaboração e presteza na preparação das lâminas de histologia.

Aos funcionários do Laboratório de Patologia Clínica do Hospital São Lucas da PUCRS, pelo apoio no armazenamento das alíquotas sorológicas.

Às funcionárias do Laboratório de Ressonância Nuclear Magnética do Hospital São Lucas da PUCRS, pela colaboração e cortesia durante a realização deste trabalho.

À Sirlei Ferreira Reis, secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde Cardiologia e Ciências Cardiovasculares da UFRGS, pela atenção, presteza e gentileza sempre presentes.

À Giquitibá Moraes de Melo, funcionário da Faculdade de Medicina da PUCRS, pelo trabalho de editoração gráfica e imagens.

Aos pacientes que colaboraram neste estudo.

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS.....	5
AGRADECIMENTOS.....	6
LISTA DE TABELAS.....	10
LISTA DE FIGURAS.....	11
<b>1 MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>12</b>
1.1 Aterosclerose e inflamação.....	12
1.2 Doença aterosclerótica cerebrovascular.....	13
1.3 Doença oclusiva de carótidas.....	14
1.4 Endarterectomia carotídea.....	15
1.5 Vulnerabilidade da placa aterosclerótica na doença carotídea.....	17
1.6 Hemorragia intraplaca.....	18
1.7 Metaloproteinases de matriz.....	19
1.8 Metaloproteinases de matriz e hemorragia intraplaca.....	21
<b>2 JUSTIFICATIVA DA PESQUISA E HIPÓTESES.....</b>	<b>21</b>
<b>3 OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>23</b>
<b>4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>23</b>
<b>5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>24</b>
<b>6 ARTIGO ORIGINAL.....</b>	<b>32</b>
6.1 Summary.....	33
6.2 Introduction.....	35
6.3 Methods.....	36
6.3.1 Patients.....	36



6.3.2	Clinical characterization.....	37
6.3.3	Magnetic resonance imaging.....	38
6.3.4	Serum markers.....	39
6.3.5	Surgical technique.....	40
6.3.6	Histological analysis.....	40
6.3.7	Statistical analysis.....	41
6.4	Results.....	42
6.4.1	Patients characteristics.....	42
6.4.2	Magnetic resonance findings.....	43
6.4.3	Serum levels of matrix metalloproteinases.....	43
6.4.4	Predictors of intraplaque hemorrhage.....	45
6.5	Discussion.....	45
6.6	References.....	49
<b>7</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>63</b>
7.1	Termo de consentimento livre e esclarecido.....	64
7.2	Ficha de avaliação clínica.....	67
7.3	Ficha de avaliação neurológica.....	69
7.4	Ficha laboratorial.....	70
7.5	Ficha angiográfica.....	71
7.6	Ficha de análise histológica.....	72

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO ORIGINAL

- Tabela 1** Clinical characteristics according to the presence of hyperintense.....56  
signal on MRI
- Tabela 2** Serum markers and intraplaque hemorrhage by histological.....57  
analysis

## LISTA DE FIGURAS

### MARCO TEÓRICO

- Figura 1** Exemplos de HIP da mesma lesão aterosclerótica (A e B) e em ampliados (C e D). Frequência de HIP em locais remotos da lesão culpada (E).....18

### ARTIGO ORIGINAL

- Figura 1** Metalloproteinases according to luminal stenosis levels in the carotid vasculature in patients who underwent carotid endarterectomy.....59
- Figura 2** MMP-1 (A), MMP-3 (B) and MMP-9 (C) levels in patients with or without hyperintense signal in high-resolution MRI.....60

## 1 MARCO TEÓRICO

### 1.1 Aterosclerose e inflamação

Originalmente considerada um distúrbio decorrente do acúmulo progressivo de lipoproteínas do colesterol nas paredes dos vasos, a aterosclerose é atualmente reconhecida como uma doença inflamatória crônica multifatorial do sistema arterial (1,2). O reconhecimento dessa natureza inflamatória é clinicamente importante visto que somente 50% dos pacientes com aterosclerose apresentam dislipidemia (3). Além disso, a prevalência de outros fatores de risco tradicionais como o tabagismo, o diabetes e a hipertensão arterial é similar entre pacientes com doença cardiovascular documentada e indivíduos da mesma faixa etária sem a doença (4).

A disfunção endotelial é considerada o evento inicial do processo inflamatório, levando à progressão e degeneração da placa aterosclerótica (5). A agressão do endotélio por agentes nocivos de ação local ou sistêmica, como acúmulo de lipoproteínas, estresse mecânico e oxidativo, agentes infecciosos, uremia, toxinas do cigarro, variações genéticas, homocisteinemia, doenças auto-imunes, entre outros, implica em alteração da homeostase local, desencadeando diversas reações de resposta (2,5). Os principais elementos que caracterizam a resposta à lesão endotelial são as alterações de adesividade, permeabilidade, capacidade proliferativa e trombogênese. Inicialmente, o endotélio lesado perde sua propriedade de não-aderência a células circulantes, produzindo moléculas de adesão, integrinas e selectinas, que modulam o recrutamento e proliferação de monócitos, macrófagos, linfócitos e plaquetas na parede vascular. Estes elementos celulares ativados promovem a liberação de citocinas, interleucinas, fator de necrose tumoral- $\alpha$ , interferon- $\alpha$ , fator quimiotático de monócitos, CD40 ligante, metaloproteinases de matriz extracelular, entre outros. Então, ocorre retroalimentação positiva pró-inflamatória, 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 (2).

A alteração da permeabilidade endotelial leva à deposição subendotelial de partículas de LDL oxidado que, por sua vez, são seqüestradas, modificadas e fagocitadas por macrófagos, originando as células espumosas (*foam cells*) que caracterizam histologicamente a lesão precoce (2,6,7).

A manutenção do estímulo pró-inflamatório leva à fase proliferativa, com 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 de fibroblastos, formando a capa fibrosa. Assim, a lesão precoce transforma-se em placa madura, que apresenta crescimento excêntrico e remodelamento positivo (2,6,7).

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 extracelular (2,6,7,8).

Por sua vez, as metaloproteinases de matriz promovem a degradação do colágeno e, em 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 quadros de síndrome coronariana aguda, síndromes isquêmicas viscerais ou de extremidades e, quando comprometem a circulação extra e intracraniana, podem culminar em quadros de isquemia cerebral (2,6).

## **1.2 Doença aterosclerótica cerebrovascular**

A doença aterosclerótica cerebrovascular tem alta prevalência nos países desenvolvidos e no Brasil, constituindo-se na segunda maior causa de morte e principal causa de incapacitação na população adulta mundial (9,10,11). 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 (12). Nos EUA, ocorrem mais de 700.000 casos novos ou recorrentes de AVE anualmente, e destes, 160.000 são fatais. Aproximadamente 80% de todos os AVEs são de origem isquêmica, e 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 importante alvo para a prevenção primária e secundária (13-15).

### **1.3 Doença oclusiva de carótidas**

Na aterosclerose carotídea, os sintomas geralmente estão relacionados à embolização ou trombose relacionada à placa aterotrombótica localizada na bifurcação, resultando em isquemia do território cerebral acometido (16).

As manifestações da isquemia cerebral dependerão do território vascular comprometido, dos mecanismos compensatórios, relacionados ao estado hemodinâmico geral do paciente e dos ramos colaterais a partir do polígono de *Willis*. As manifestações de insuficiência vascular cerebral apresentam formas diversas e quadros clínicos que variam de ligeiros distúrbios visuais e sensações 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 (17,18).

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 AVE. Entretanto, se o déficit neurológico dura mais de 24 horas, caracterizando o infarto cerebral, denomina-se AVE, independentemente da recuperação futura ou do grau de seqüela neurológica. Atualmente, tal distinção é reconhecidamente arbitrária, visto que danos teciduais permanentes são encontrados em até 25% dos pacientes com AITs (17,18,19).

## 1.4 Endarterectomia carotídea

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 realizados na década de 1990, baseados principalmente no percentual de estenose, estabelecem critérios de indicação cirúrgica e demonstram que a EC diminui a incidência de AVE e morte em pacientes sintomáticos ou assintomáticos (17,20-23).

Em 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 estabelecido. Nesses casos, o benefício da EC foi claramente estabelecido por meio dos resultados de dois ensaios clínicos, o *North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial (NASCET)* e o *European Carotid Surgery Trial (ECST)* (24,25).

No estudo *NASCET*, publicado em 1991, pacientes com estenose de carótida igual ou superior a 70% na angiografia e com AIT ou AVE não incapacitante nos últimos 120 dias foram randomizados para receberem terapia antiagregante plaquetária (TAP) ou TAP e endarterectomia carotídea. Em 659 casos analisados, a incidência em 2 anos de AVE ipsilateral incapacitante foi significativamente maior no grupo clínico (26%) do que no grupo cirúrgico (9%), com uma redução do risco relativo de 65% (24).

Posteriormente, os pesquisadores do *NASCET* estudaram os resultados da EC em pacientes com estenose carotídea moderada (entre 30 e 69%). Nos casos de obstruções entre 30 e 49% não houve benefício com a intervenção cirúrgica, mas em pacientes com estenoses entre 50 e 69%, houve um benefício estatisticamente significativo no grupo da EC; porém, de menor magnitude do que o observado nos indivíduos com estenose severa. A redução na incidência de AVE ipsilateral com a EC foi de 4,4% em 90 dias, e este benefício manteve-se em 8 anos de seguimento, o que justifica a realização do procedimento nesta situação, desde que a taxa acumulada de AVE e óbito intra-hospitalar da equipe cirúrgica não exceda à encontrada no estudo (3%) (26).

No estudo *ECST*, que também incluiu pacientes sintomáticos com estenose  $\geq$  70%, os 1.811 casos alocados para tratamento cirúrgico apresentaram redução

relativa de risco de 84% para o desfecho AVE maior, comparados aos 1.213 pacientes tratados clinicamente, com maior benefício nos pacientes com estenoses superiores a 80%, e nos homens em relação às mulheres. As análises finais do estudo *ECST* ainda demonstraram o benefício da EC no grupo de pacientes com estenose entre 50% e 69% na angiografia, e resultados piores em comparação à terapia antiplaquetária nas lesões menores que 30%, devendo nestes casos ser contra-indicada (27,28,29).

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 em indivíduos assintomáticos, são dados menos robustos em comparação aos estabelecidos para os casos sintomáticos. Os principais ensaios clínicos demonstrando os resultados da EC em pacientes assintomáticos são o *Asymptomatic Carotid Atherosclerosis Study (ACAS)* e o *Asymptomatic Carotid Surgery Trial (ACST)* (30,31).

No estudo *ACAS*, 1.662 pacientes com estenose igual ou maior que 60%, diagnosticada por ultrassonografia ou arteriografia, foram randomizados para receberem TAP, ou EC e TAP, e acompanhados por 5 anos. No grupo submetido a tratamento clínico, a taxa de AVE ipsilateral foi de 11%, pouco mais do que o dobro da observada nos pacientes operados (5%). A redução absoluta do risco foi de 5,9%, e de risco relativo de 55%, sendo este benefício mais significativo nos homens, pela elevada taxa de complicações observadas no sexo feminino (3,6% contra 1,2%). O estudo *ACAS* sustenta a recomendação atual de indicar EC para pacientes com estenose superior a 60%, desde que os resultados de morbidade e mortalidade da equipe cirúrgica não ultrapassem a 3% (30).

O ensaio europeu *ACST* recrutou mais de 3.000 casos assintomáticos de estenose carotídea  $\geq 70\%$ , analisados por ultrassonografia. Nesse estudo, os autores observaram que houve redução de 50% no risco relativo de AVE ipsilateral ou morte no grupo alocado para tratamento cirúrgico após o seguimento de 5 anos (31,32).



## 1.5 Vulnerabilidade da placa aterosclerótica na doença 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 (33). Desta forma, embora o percentual de estenose atualmente ainda defina a tomada de decisões terapêuticas na patologia carotídea, é reconhecido que os eventos cerebrovasculares são determinados por placas vulneráveis (34,35), com fortes evidências sugerindo que os sintomas clínicos e a morbidade resultante da doença estão relacionados à instabilidade (36-41).

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 em pacientes sintomáticos e somente 1 entre 10 AVEs em pacientes assintomáticos. Além disso, os benefícios da EC diminuem com o retardo da cirurgia, embora seja improvável que o grau de estenose tenha mudado significativamente no mesmo período de tempo. Então, outras propriedades da placa, além do grau de obstrução isoladamente, são importantes para identificar pacientes com risco de AVE (22,25,29,30).

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 endarterectomias carotídeas 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 em nível celular e molecular (33-35).

Neste contexto, o reconhecimento precoce das características de instabilidade da placa pode identificar um grupo de pacientes com potencial para complicações trombóticas e que poderia se beneficiar de intervenções mais agressivas ou precoces (42-45).

## 1.6 Hemorragia intraplaca

A alta prevalência de hemorragia intraplaca (HIP) em 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 (Figura 1) (42). 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 moderada especificidade (46). O sangramento dentro da parede do vaso pode estimular a progressão do processo aterosclerótico, por aumento do núcleo lipídico e conseqüente aumento do volume da placa, e também por estímulo de novos fatores desestabilizadores (47).

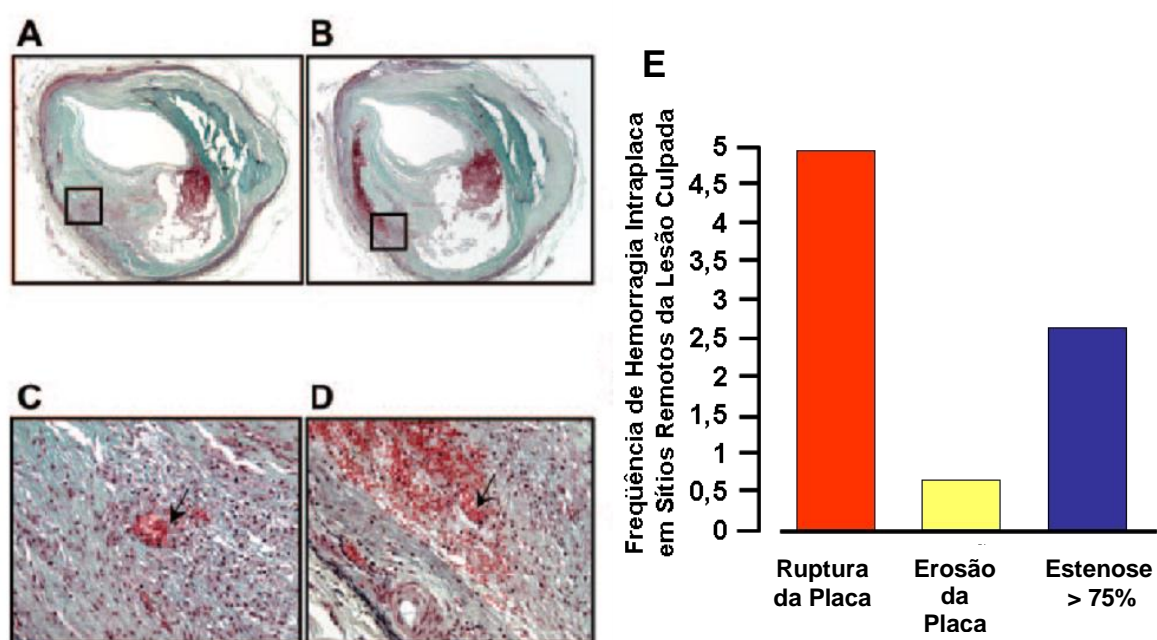


Figura 1. Exemplos de HIP da mesma lesão aterosclerótica (A e B) e em ampliados (C e D). Frequência de HIP em locais remotos da lesão culpada (E). Adaptado de Virmani *et al* (42).

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. (48) 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 (49). Além disso, um estudo mais recente (50) demonstrou que a HIP detectada por RNM pode prever eventos cerebrovasculares recorrentes em pacientes com estenose carotídea grave (60% a 99%). Do mesmo modo, Albuquerque e cols. (51) demonstraram, em um estudo analisando 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 a elevação 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.

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 (52). Adicionalmente, o microambiente pró-oxidativo pode induzir alterações estruturais na hemoglobina livre extra-eritrocitária, agindo como um sinal danoso ao sistema imune e, assim, contribuindo para o processo inflamatório que acontece dentro do ateroma (53).

### **1.7 Metaloproteinases de matriz**

As metaloproteinases de matriz (MMPs) são enzimas proteolíticas que degradam o colágeno e outros componentes da matriz extracelular. Mais de 20 MMPs já foram identificadas, incluindo as collagenases intersticiais (MMP-1), gelatinases (MMP-2 e -9) e estromelisinases (MMP-3) (53). A MMP-1 cliva o colágeno

tipo I e II, que são os principais componentes estruturais da capa fibrosa. A MMP-2 está envolvida na clivagem de diversos tipos de substratos, como gelatinas, colágenos tipo IV, V, VII, X e XI, fibronectina, elastina e proteoglicanos. A MMP-9 apresenta especificidade por colágenos tipo I, III, IV e V e também por gelatinas, proteoglicanos e elastina. 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 (54).

A atividade das MMPs é regulada em múltiplos níveis, incluindo a transcrição e síntese de zimogênios inativos, ativação de zimogênios, e inibição endógena pelos inibidores tissulares de MMPs (TIMPs) (39,55). Alterações em qualquer um desses mecanismos podem levar à expressão aumentada de MMPs, que parece estar relacionada a condições patológicas de remodelamento vascular, incluindo a instabilização da placa aterosclerótica (56,57).

Desta forma, o papel dessas proteinases na ocorrência de eventos isquêmicos cerebrovasculares vem recebendo atenção. Estudos histológicos demonstraram que níveis elevados de MMPs podem ser encontrados em áreas instáveis de placas ateroscleróticas de endarterectomia carotídea (58,59). Alvarez e cols. (60), por sua vez, demonstraram uma associação entre níveis elevados de MMP-9 e placas instáveis em pacientes com eventos neurológicos prévios, e uma correlação positiva entre níveis séricos desta gelatinase e a presença de macrófagos em espécimes de endarterectomia carotídea. Estudando 404 pacientes submetidos à endarterectomia carotídea, Verhoeven e cols. (61) encontraram níveis elevados de MMP-8 e MMP-9 nas placas de ateroma dos pacientes com história prévia de AIT e AVE. Além disso, níveis elevados de MMP-9 em pacientes com estenose carotídea acima de 50% foram associados com risco duas vezes maior de AVE ipsilateral e morte cardiovascular (62). Sapienza e cols. (63) também demonstraram níveis plasmáticos elevados de MMP-1, -2, -3, e -9 em pacientes com placas instáveis comparados a pacientes com placas estáveis e voluntários saudáveis. Além disso, as placas instáveis apresentaram atividade, produção e expressão de MMPs aumentadas. No mesmo estudo, a expressão de TIMP-1 e -2 mostrou-se diminuída em 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 intensa colagenólise mediada por MMP-1 e -13 (64).

### **1.8 Metaloproteinases de matriz e hemorragia intraplaca**

Parece haver uma correlação entre alguns tipos de MMPs e a ocorrência de HIP. Nikkari e cols. (65,66) observaram a expressão de MMP-1 somente em carótidas humanas com aterosclerose avançada e HIP em comparação a carótidas com íntimas normais. Mais recentemente, Nooijer e cols. (67), em um estudo experimental com ratos, demonstraram que, em lesões ateroscleróticas intermediárias, a MMP-9 promove progressão da placa, afinamento da capa fibrosa, e remodelamento positivo, não influenciando na incidência de HIP, ruptura ou trombose. Já em lesões ateroscleróticas avançadas e complexas, a MMP-9 relaciona-se à morfologia da placa vulnerável, acompanhada de alta incidência de HIP. Já Tziakas e cols. (68), em um estudo envolvendo apenas 18 pacientes consecutivos submetidos à endarterectomia carotídea, 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 correlação entre níveis séricos de MMPs, HIP e instabilidade da placa.

## **2 JUSTIFICATIVA DA PESQUISA E HIPÓTESES**

A doença oclusiva cerebrovascular é causada primordialmente por aterosclerose carotídea e tem alta incidência e prevalência 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 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. As placas vulneráveis são caracterizadas pela presença de necrose ou de hemorragia intraplaca no seu núcleo, separada do lúmen por uma tênue e instável capa fibrosa, além de infiltração de células inflamatórias em áreas específicas. Atualmente, há vários estudos sugerindo que os métodos não-invasivos como a ultrassonografia e a RNM, não somente podem confirmar o percentual de estenose e permitir adequado planejamento cirúrgico, como 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, utilizando a seqüência '*T1-weighted*', pode identificar com adequada acurácia a presença de hemorragia intraplaca na avaliação pré-operatória de pacientes submetidos à endarterectomia.

A aterosclerose hoje é reconhecida como uma doença inflamatória crônica e sistêmica, substituindo o conceito tradicional de entidade relacionada apenas ao acúmulo progressivo de lipídios na parede arterial. Os 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, trabalhos recentes têm procurado esclarecer o papel dos vários mediadores inflamatórios circulantes envolvidos na formação, no crescimento e, possivelmente, na instabilização da placa.

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 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. O papel destas enzimas no desenvolvimento e instabilização das placas ateroscleróticas carotídeas já foi bastante estudado; entretanto, até o momento, pouco se sabe sobre a relação entre as MMPs e a presença de sangramento intraplaca. O presente projeto pretende testar a hipótese que níveis séricos de MMPs estão aumentados nos pacientes submetidos à endarterectomia carotídea que apresentam hemorragia intraplaca.

### 3 OBJETIVO GERAL

**Avaliar marcadores séricos que identifiquem características clínicas, radiológicas e histopatológicas de vulnerabilidade da placa aterosclerótica carotídea.**

### 4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar os níveis séricos das MMP-1, MMP-3 e MMP-9 em pacientes submetidos à endarterectomia de carótidas.
- Avaliar a correlação entre os níveis séricos das MMP-1, MMP-3 e MMP-9 e os sintomas neurológicos.
- Avaliar a correlação entre os níveis séricos das MMP-1, MMP-3 e MMP-9 e as características radiológicas de instabilidade, definida pela presença de hemorragia intraplaca na seqüência '*T-weighted*'.
- Avaliar a correlação entre os níveis séricos das MMP-1, MMP-3 e MMP-9 e o achado histopatológico de hemorragia intraplaca.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ross R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115-126.
2. Mullenix PS, Andersen CA, Starnes BW. Atherosclerosis as inflammation. *Ann Vasc Surg* 2005;19:130-138.
3. EUROASPIRE: A European Society of Cardiology survey of secondary prevention of coronary heart disease: principal results. *Eur Heart J* 1997;18:1569-1582.
4. Greenland P, Knoll MD, Stamler J, Neaton JD, Dyer AR, Garside DB et al. Major risk factors as antecedents of fatal and nonfatal coronary heart disease events. *JAMA* 2003;290:891-897.
5. Landmesser U, Hornig B, Drexler H. Endothelial function: a critical determinant in atherosclerosis? *Circulation* 2004;109(21 Suppl 1):II27-33.
6. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002;420:868-874.
7. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002;105:1135-1143.
8. Stoll G, Bendszus M. Inflammation and atherosclerosis – novel insights into plaque formation and destabilization. *Stroke* 2006;37:1923-1932.
9. 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.
10. Indicadores básicos para a saúde no Brasil: conceitos e aplicações/ Rede Interagencial de Informação para a Saúde – Ripsa – 2ª Edição – Brasília: Organização Pan-Americana da Saúde, 2008. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/idb2006/indicadores.pdf>>. Acesso em: 08 nov. 2008.



11. Donnan GA, Fisher M, Macleod M, Davis SM. Stroke. *Lancet* 2008;371:1612-1623.
12. Hankey GJ. Stroke: how large a public health problem, and how can the neurologist help? *Arch Neurol* 1999; 56:748-754.
13. Pasternak RC, Criqui MH, Benjamin EJ, Fowkes FG, Isselbacher EM, McCullough PA et al. Atherosclerotic Vascular Disease Conference: Writing Group I: Epidemiology. *Circulation* 2004;109:2605-2612.
14. Sacco RL, Adams R, Albers G, Alberts G, Alberts M, Benavente O et al. 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.
15. Goldstein LB, Adams R, Alberts MJ, Appel LJ, Brass LM, Bushnell CD et al. Primary Prevention of Ischemic Stroke: A Guideline From the American Heart Association/ American Stroke Association Stroke Council. *Stroke* 2006;37:1583-1633.
16. Sitzer 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.
17. Albuquerque LC, Narvaes LB, Filho JRH, Anes M, Maciel AA, Staub H et al. Vulnerabilidade da doença aterosclerótica de carótidas: do laboratório à sala de cirurgia – parte I. *Rev Bras Cir Cardiovasc* 2006;21:127-135.
18. 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.pp.1713-1730.
19. 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.
20. Goldstein LB. Extracranial carotid artery stenosis. *Stroke* 2003;34:2767-2773.

21. Howell SJ. Carotid endarterectomy. *Br J Anaesth* 2007;99:119-131.
22. Hobson RW II, Mackey WC, Ascher E, Murad H, Calligaro KD, Comerota AJ et al. Management of atherosclerotic carotid artery disease: clinical practice guidelines of the Society for Vascular Surgery. *J Vasc Surg* 2008;48:480-486.
23. Bonamigo TP, Lucas ML. A endarterectomia carotídea é a melhor opção para os pacientes com doença carotídea. *Arq Bras Cardiol* 2008;91:e29-e32.
24. 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.
25. 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.
26. Barnett HJM, Taylor DW, Eliasziw M, Fox AJ, Ferguson GG, Haynes RB et al. 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.
27. European Carotid Surgery Trialist's Collaborative Group: Endarterectomy for moderate symptomatic stenosis: Interim results from the MRC European Carotid Surgery Trial. *Lancet* 1996;347:1591-1593.
28. European Carotid Surgery Trialist's Collaborative Group. Randomised trial of endarterectomy for recently symptomatic carotid stenosis: final results of the MRC European Carotid Surgery Trial (ECST). *Lancet* 1998;351:1379-1387.
29. 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.
30. Executive Committee for the Asymptomatic Carotid Atherosclerosis Study: Endarterectomy for asymptomatic carotid artery stenosis. *JAMA* 1995;273:1421-1428.

31. 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.
32. 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.
33. Golledge J, Greenhalgh RM, Davies AH. The symptomatic carotid plaque. *Stroke* 2000;31:774-781.
34. Davies MJ. Stability and instability: two faces of coronary atherosclerosis. *Circulation* 1996;94:2013-2020.
35. Nighoghossian N, Derex L, Douek P. The vulnerable carotid artery. *Stroke* 2005;36:2764-2772.
36. Saam T, Hatsukami TS, Takaya N, Chu B, Underhill H, Kerwin WS et al. The vulnerable, or high-risk, atherosclerotic plaque: noninvasive MR imaging for characterization and assessment. *Radiology* 2007; 244:64-77.
37. 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.
38. 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.
39. 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.
40. Moody AR, Murphy RE, Morgan PS, Martel AL, Delay GS, Alder S et al. Characterization of complicated carotid plaque with magnetic resonance direct thrombus imaging in patients with cerebral ischemia. *Circulation* 2003;107:3047-3052.

41. Burke AP, Kolodgie FD, Farb A, Weber DK, Malcom GT, Smialek J et al. Healed plaque ruptures and sudden coronary death: evidence that subclinical rupture has a role in plaque progression. *Circulation* 2001;103:934-940.
42. Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Finn AV, Gold HK, Tulenko TN et al. Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture. Angiogenesis as a source of intraplaque hemorrhage. *Arterioscler Vasc Biol* 2005;25:2054-2061.
43. Kwee RM, van Oostenbrugge RJ, Hofstra L, Teule GJ, Engelshoven JM, Mess WH et al. Identifying vulnerable carotid plaques by noninvasive imaging. *Neurology* 2008;70:2401-2409.
44. Spagnolli LG, Mauriello A, Sangiorgy G, Fratoni S, Bonanno E, Schwartz RS et al. Extracranial thrombotically active carotid plaque as a risk factor for ischemic stroke. *JAMA* 2004;291:1845-1852.
45. Redgrave JNE, Lovett JK, Gallager 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.
46. Naghavi M, Libby P, Falk E, Casscells SW, Litovsky S, Rumberger J et al. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definition and risk assessment strategies: part I. *Circulation* 2003;108:1664-1672.
47. Chu B, Kampschulte A, Ferguson MS, Kerwin WS, Yarnykh VL, O'Brien KD et al. Hemorrhage in the atherosclerotic carotid plaque: a high-resolution MRI study. *Stroke* 2004;35:1079-1084.
48. Takaya N, Yuan C, Chu B, Saam T, Polissar NL, Jarvik NL et al. Presence of intraplaque hemorrhage stimulates progression of carotid atherosclerotic plaques. A high-resolution magnetic resonance imaging study. *Circulation* 2005;111:2768-2775.
49. Takaya N, Yuan C, Chu B, Saam T, Underhill H, Cai J et al. Association between carotid plaque characteristics and subsequent ischemic cerebrovascular events. A prospective assesment with MRI – initial results. *Stroke* 2006;37:818-823.

50. 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.
51. Albuquerque LC, Narvaes LB, Maciel AA, Staub H, Friedrich M, Hoefel Filho JR et al. Intraplaque hemorrhage assessed by high-resolution magnetic resonance and C-reactive protein in carotid atherosclerosis. *J Vasc Surg* 2007;46:1130-1137.
52. Kolodgie FD, Gold HK, Burke AP, Fowler DR, Kruth HS, Weber DK et al. Intraplaque hemorrhage and progression of coronary atheroma. *N Engl J Med* 2003;349:2316-2325.
53. Buttari B, Profumo E, Petrone L, Pietraforte D, Siracusano A, Margutti P et al. Free hemoglobin: a dangerous signal for the immune system in patients with carotid atherosclerosis? *Ann N Y Acad Sci* 2007;1107:42-50.
54. Rohde LE, Lee RT. Pathophysiology of atherosclerotic plaque development and rupture: an overview. *Sem Vasc Med* 2003;3:349-356.
55. Sapienza P, Marzo L, Borrelli V, Sterpetti AV, Mingoli A, Piagnerelli R et al. Basic fibroblast growth factor mediates carotid plaque instability through metalloproteinase-2 and -9 expression. *Eur J Vasc Surg* 2004;28:89-97.
56. Galis ZS, Khatri JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: The good, the bad, and the ugly. *Circ Res* 2002;90:251-262.
57. Abilleira S, Bevan S, Markus HS. The role of genetic variants of matrix metalloproteinases in coronary and carotid atherosclerosis. *J Med Genet* 2006;43:897-901.
58. 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.
59. Loftus IM, Naylor AR, Goodall S, Crowther M, Jones L, Bell PR et al. Increased matrix metalloproteinase-9 activity in unstable carotid plaques. A potential role in acute plaque disruption. *Stroke* 2000;31:40-47.

60. 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.
61. Verhoeven B, Hellings WE, Moll FL, de Vries JP, Kleijn DPV, Bruin P et al. Carotid atherosclerotic plaques in patients with transient ischemic attacks and stroke have unstable characteristics compared with plaques in asymptomatic and amurosis fugax patients. *J Vasc Surg* 2005;42:1075-1081.
62. 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.
63. Sapienza P, di Marzo L, Borrelli V, Sterpetti AV, Mingoli A, Cresti S et al. Metalloproteinases and their inhibitors are markers of plaque instability. *Surgery* 2005;137:355-363.
64. Sukhova G, Schonbeck U, Rabkin E, Shoen FJ, Poole R, Billingham RC et al. Evidence for increased collagenolysis interstitial collagenases-1 and -3 in vulnerable human atheromatous plaques. *Circulation* 1999;99:2503-2509.
65. 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.
66. Nikkari ST, O'Brian KD, Ferguson M, Hatsukami T, Welgus HG, Alpers CE et al. Interstitial collagenase (MMP-1) expression in human carotid atherosclerosis. *Circulation* 1995;92:1393-1398.
67. de Nooijer R, Verkleij CJ, von der Thüsen JH, Jukema JW, van der Wall EE, van Berkel TJ et al. 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.

68. Tziakas DN, Lazarides MK, Tentes IK, Georgiadis GS, Eleftheriadou E, Chalikias GK et al. 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.

**6 ARTIGO ORIGINAL**

**Serum Matrix Metalloproteinases and Intraplaque Hemorrhage assessed  
by High-Resolution Magnetic Resonance in Carotid Atherosclerosis**

**Cover Title: MRI, MMPs and Carotid Atherosclerosis**

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

**From the Adult Cardiovascular Surgery Division from São Lucas Hospital  
of the Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, the Pathology  
Division and the Cardiology Division of Hospital de Clínicas de Porto  
Alegre.**

**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 21018659; Fax # – 55 5121018657**

**e-mail lerohde@terra.com.br**



## 6.1 SUMMARY

**Introduction** – Carotid intraplaque hemorrhage (IPH) is a marker of atheroma instability. Matrix metalloproteinases (MMPs) are enzymes that participate in the processes that lead to plaque destabilization and might be involved in IPH pathogenesis. In the present study, we evaluated the potential association between serum levels of MMPs with *in vivo* assessment of IPH by high-resolution magnetic resonance imaging (MRI).

**Methods** – Consecutive patients submitted to carotid endarterectomy underwent high-resolution MRI; independent evaluation of neurological symptoms; histological analysis and measurement of serum MMP-1, MMP-3 and MMP-9. IPH was determined non-invasively by the presence of a hyperintense signal at MRI (T1-weighted sequence).

**Results** – Eighty-two predominantly male (66%) and hypertensive (89%) patients (67 ± 9 years-old) were studied. MR angiography identified 19 (23%) patients with stenosis between 50 and 69%, 23 (28%) with stenosis between 70 and 90%, and 40 (49%) with stenosis greater than 90%. High-resolution MRI depicted a hyperintense signal suggestive of intraplaque bleeding in 48 (58.5%) subjects. No clinical characteristic was predictive of the hyperintense signal at MRI (all p values > 0.10). Serum MMPs were similar in different degrees of carotid stenosis assessed by MR angiography, but MMP-9 levels were significantly higher in clinically unstable patients (p=0.047) and in those with a positive hyperintense

signal at MRI ( $p=0.01$ ). In a multivariate analysis of potential serum predictors of IPH, MMP-9 was the only predictor of IPH (increments of 10 ng/mL with an odds ratio of 1.51, 95% confidence interval = 1.06 to 2.20,  $p$  value = 0.018; c statistics = 0.65), while in a model adjusted for other clinical variables, history of recent neurological symptoms was the only variable independently associated to IPH ( $p < 0.001$ ; c statistics = 0.85).

**Conclusions** – Intraplaque hemorrhage evaluated by MRI identified neurologically unstable patients, with increased levels of MMP-9 associated with IPH, regardless of the degree of carotid stenosis.

**Key words:** atherosclerosis, hemorrhage, carotid artery, inflammation

## 6.2 INTRODUCTION

Stroke is a major cause of morbidity and mortality in the adult population (1,2). Thromboemboli from carotid atherosclerotic plaques are responsible for approximately 30% of cerebral ischemic episodes. Carotid endarterectomy is the most widely accepted interventional method of treating carotid atherosclerosis (3) and its indication is based primarily on the degree of luminal stenosis (4-6), although a well-established body of evidence suggests that acute vascular events occur mostly due to the instability of the atherosclerotic plaques (7-9). The so-called vulnerable atheroma is largely responsible for the clinical complications of atherosclerosis and precedes the onset of most clinical ischemic events (10). Plaque instability is characterized by a thin and at times ulcerated fibrous cap that usually evolves to plaque rupture.

In this scenario, intraplaque hemorrhage (IPH) has emerged as a central aspect in the events that lead to plaque instability. Recent studies suggest that IPH may represent a potent atherogenic stimulus contributing to macrophage infiltration and enlargement of the necrotic core (11). Moreover, the pro-oxidative intraplaque microenvironment may induce structural changes in extra-erythrocytic free hemoglobin, acting as a dangerous signal for the immune system and thus contributing to the inflammatory process that takes place within the atherosclerotic plaque (12). In carotid atherosclerotic plaques, IPH is a common feature that is involved in the pathogenesis of cerebral ischemic

symptoms and may be accurately identified non-invasively by high resolution magnetic resonance imaging (MRI) (13).

Matrix metalloproteinases (MMPs) are a family of at least 26 different zinc-dependent endopeptidases that are responsible for the degradation of extracellular matrix (ECM) proteins. 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 (14,15). Elevated levels of serum MMPs are associated to the presence of macrophages in the plaque and identify patients with recent neurologic symptoms and worse prognosis (16,17). The role of MMPs on the development of IPH is not well-known, but recent experimental data on carotid arteries suggest that lesional overexpression of MMP-9 might be involved in pathogenesis of IPH especially in advanced lesions (18).

In the present cross-sectional study we enrolled consecutive patients submitted to carotid endarterectomy to evaluate the potential association of serum levels of MMP-1, MMP-3 and MMP-9 with *in vivo* morphological evaluation of the carotid atheroma by high-resolution MRI aiming at the detection of IPH.

## **6.3 METHODS**

### **6.3.1 Patients**

The present study enrolled patients with definite carotid atherosclerotic disease and internationally-accepted, guideline-based criteria for carotid endarterectomy (19,20). 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, those who were unable to undergo MRI or whose atherosclerotic plaque was considered to be unsuitable for histological analysis (n = 2) were not included in the present study. Also, 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 surgical or percutaneous interventions during the previous 90 days were also excluded, as all these conditions might increase serum inflammatory markers. The present protocol was approved by the Ethics Committee of that institution and all patients signed a written informed consent form before enrollment.

### **6.3.2 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.

### **6.3.3 Magnetic resonance imaging**

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.

MRA was performed by the usual technique, in weighted 3D TOF (*time-of-flight*) pulse sequences, corresponding to the noncontrast phase, and gradient 3D Turboflash, related to the contrast phase (intravenous gadolinium). Luminal stenosis was determined according to *NASCET* criteria (21) evaluated by the relation between the smallest diameter of the narrowed segment and the largest diameter of the internal carotid artery, distal to the lesion. The graduation of stenosis was adapted from Nederkoorn et al (22), divided into three categories: 50 to 69% stenosis, 70 to 90% stenosis, and stenosis greater than 90%.

The technique used to detect areas of hemorrhage was similar to the protocol described by Moody et al (23), with the purpose of identifying the presence of methemoglobin in the extracellular matrix. We used a three-

dimensional MPRAGE pulse sequence, with 10.3 ms of repetition time, 4 ms of echo time and 1000 ms of delay time, flip angle 15°, 1 acquisition. Fat suppression was used for T1W images to reduce signals from subcutaneous tissue. This combination produced signal amplification in T1W in areas containing recent thrombus or hemorrhage, identified by the hyperintense signal (carotid high signal). Whenever the brightness was more intense than in adjacent soft tissues, the signal was classified as positive for acute or recent hemorrhage. Images were obtained with a 30 x 30 cm<sup>2</sup> field of view, matrix size 256, and 1.07 mm slice thickness. MRIs were interpreted by two experienced blinded reviewers. The highest percentage of stenosis prevailed in the case of disagreement between the reviewers. Plaque length was measured and the proximal and distal margins were defined for comparisons with histology findings.

#### **6.3.4 Serum markers**

In the operating room, before anesthetic induction, 20 mL of blood were drawn from a peripheral vein and immediately processed. Hs-CRP was measured according to a nephelometric method by the Behring CardioPhase assay (Behring® Inc., Marburg, Germany), in which monoclonal antibodies to human CRP were used in a cooled serum aliquot, as previously described (24). MMP-1, MMP-3 and MMP-9 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'S were performed according to the manufacturers' instructions. These provide a specific and precise quantitative determination of enzyme levels and are based on a two-side ELISA sandwich format, using two antibodies directed against different epitopes of the enzyme.

### **6.3.5 Surgical technique**

All patients were operated by the same surgeons (L.C.A. and L.B.N.) under general anesthesia, with orotracheal intubation and monitoring of mean arterial pressure. Dissection of carotid bifurcation was performed according to the usual technique, avoiding hemostasis by compression to limit embolization or disarrangement of the plaque architecture. After infusion of intravenous heparin (1.0 mg/kg), an anterior longitudinal arteriotomy was performed, long enough to reach the margin of the normal artery wall, 10 mm cranially and caudally to the lesion. The atheroma was removed by detachment and immediately stored in a 10% phormol solution. After removal of plaque debris, reversion of anticoagulation with protamine was performed (1.0 mg/kg IV).

### **6.3.6 Histological analysis**

During surgery, every effort was made to avoid disruption of the plaque anatomy and to identify both the posterior-anterior and proximal-cranial references for subsequent comparison to MRI. Thus, before infusion on phormol



solution, the posterior and cranial surfaces of plaque specimens were dyed to define spatial markers for later comparisons to MRI findings, as recommended by Lovett et al (25). After decalcification and inclusion in paraffin block, 10  $\mu$ m samples were sectioned at every 3.0 mm of the histological block and stained with standard hematoxylin-eosin. Analysis of histopathology was performed by an experienced pathologist who was unaware of clinical and laboratory data.

Characterization of intraplaque hemorrhage was adapted from Lusby et al (26), as previously described. 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.

### **6.3.7 Statistical analysis**

Continuous variables with normal distribution were expressed as mean  $\pm$  standard deviation and compared using Student t test or analysis of variance (ANOVA). Hs-CRP and 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 of MMP-3 concentration was used for statistical analysis, because logarithmic transformation was not satisfactory to correct to normal 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 SAS for Windows statistical package (version 8.0).

## **6.4 RESULTS**

### **6.4.1 Patients characteristics**

The study comprised 82 patients who underwent carotid endarterectomy. Patients were predominantly male (66%) 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: 17% had symptoms of stable angina and 12% had sustained a previous myocardial infarction. A history of a cerebral vascular attack was found in 32% of patients and a transient ischemic attack in 15%. Statins were used by 72 patients (88%), and 56 (68%) also used the antiplatelet agents aspirin, ticlopidine, or clopidogrel. Other clinical characteristics and comorbidities are described in Table 1. According to the independent neurologic evaluation 37 patients (45%) were considered stable, of whom 25 (30%) were asymptomatic, and 12 (15%) had experienced symptoms of ipsilateral ischemic stroke >90 days before carotid endarterectomy; whereas 45 (55%) were considered unstable.

#### **6.4.2 Magnetic resonance findings**

MRA with gadolinium identified 19 patients (23%) with stenosis of 50% to 69%, 23 (28%) with 70% to 90% stenosis, and 40 (49%) with > 90% stenosis. In the asymptomatic patients, 19 (23%) had luminal stenosis  $\geq$  70%, and only six (7%) were classified by MRA as having 50% to 59% carotid stenosis. In the T1W sequence, a hyperintense signal suggesting IPH was identified in 48 patients (58.5%). Age, gender, traditional cardiovascular risk factors, and history of previous myocardial infarction or peripheral arterial disease were similar in patients with or without signs of intraplaque bleeding on MRI (Table 1). Independent neurological evaluation was highly associated with signs of IPH in the MRI (p value < 0.0001). A hyperintense signal at MRI identified 91% (41 out of 45) of patients with recent neurological symptoms, while absence of a hyperintense signal identified 81% (30 out of 37) of subjects considered to be neurologically stable (asymptomatic or remotely symptomatic).

#### **6.4.3 Serum levels of matrix metalloproteinases**

In the overall population, mean MMP-1 was  $3.7 \pm 2.9$  (median of 3.5 and interquartile range of 3.1 to 3.8 ng/mL), mean MMP-3 was  $8.0 \pm 8.4$  (median of 6.2 and interquartile range of 3.2 to 10 ng/mL) and mean MMP-9 was  $211 \pm 155$  (median of 160 and interquartile range of 92 to 284 ng/mL). No significant and

clinically relevant association was observed among hs-CRP and different serum MMPs levels (all correlation coefficients  $< 0.25$ , data not shown), except for a weak to moderate positive and statistically significant association to MMP-9 ( $r = 0.34$  and  $p = 0.002$ ). MMPs also did not correlate significantly among themselves.

Figure 1 depicts MMP-1, -3 and -9 levels according to luminal stenosis strata based on MR angiography findings. We did not observe any significant differences of these serum markers in relation to different degrees of carotid atherosclerotic stenosis. However, MMP-1 was marginally augmented in patients with signs of IPH on high-resolution MRI, while MMP-9 was significantly increased ( $p = 0.01$ ) in patients with an hyperintense signal on MRI (Figure 2C).

Table 2 describes levels of potential blood-derived markers of IPH based on the histological analysis. Total leukocytes, total cholesterol and MMP-3 levels were not significantly different between patients with acute or recent IPH compared to patients with remote or none IPH. Hs-CRP and MMP-1 levels were marginally increased, while MMP-9 was significantly augmented in patients with acute and recent IPH ( $p = 0.007$ ). Analysis stratified by neurological symptoms demonstrated a similar profile, with significant increments in hs-CRP and MMP-9 levels when comparing patients with and without recent neurological complains ( $1.4 \pm 2.6$  versus  $0.7 \pm 0.9$  mg/dL and  $239 \pm 179$  versus  $174 \pm 108$  ng/mL, respectively;  $p < 0.05$ ).

#### **6.4.4 Predictors of intraplaque hemorrhage**

Two multivariate models were created to assess predictors of IPH based on high-resolution MRI. Firstly (model 1), potential serum predictors of risk were evaluated, incorporating levels of hs-CRP, MMP-1, MMP-3 and MMP-9. In this analysis, MMP-9 was the only predictor of IPH (for each increment of 10 ng/mL the odds ratio was 1.51, 95% confidence interval = 1.06 to 2.2, p value = 0.018; c statistics = 0.65). In a model adjusted for other clinical variables, history of recent neurological symptoms was the only variable independently associated to IPH ( $p < 0.001$ ; c statistics = 0.85).

### **6.5 DISCUSSION**

Atherothrombosis of the carotid bifurcation is responsible for approximately 30% of cerebral ischemic episodes and the degree of angiographic stenosis is the major determinant of surgical intervention at the present time (1-3). Several contemporary studies, however, have demonstrated that plaque vulnerability instead of luminal stenosis is associated to the risk of clinical neurological events. In fact, the vulnerable atheroma is not directly influenced by the obstructive nature of the plaque but is mainly associated with specific structural, molecular, and biochemical features (7-11,27). In the present

study, we have demonstrated that serum levels of MMP-9, a critical enzyme that degrades important components of the extracellular matrix, are elevated in patients with signs of IPH on high-resolution MRI, subsequently confirmed by histological analysis, a recognized marker of plaque vulnerability.

IPH is a critical factor in growth and destabilization of atherosclerotic plaques (28). In a relatively large series of human coronary plaques from sudden coronary death victim, there was a greater frequency of previous hemorrhages in coronary atherosclerotic lesions prone to rupture. Importantly, the degree of reactive glycoprotein A staining and the level of iron deposits in the plaque corresponded to the size of the necrotic core, and changes in these variables paralleled an increase in macrophage density, suggesting that hemorrhage itself serves as an inflammatory stimulus (11). Animal models of IPH offered additional evidence that episodic hemorrhages in plaques contribute to free cholesterol accumulation, macrophage infiltration and the overall dimension of the atheroma. The contribution of erythrocyte membrane cholesterol to necrotic core volume is predicted to be substantial because IPH is thought to occur repeatedly over years. These processes seem to be particularly prevalent in the carotid vasculature (29). In addition, recent experimental evidence strongly supports the concept that bleeding inside the plaque is a major autoimmune stimulus that perpetuates the chronic inflammatory component of the atheroma. IPH, a common event in advanced lesions, causes the deposition of large amounts of hemoglobin. The pro-oxidative intraplaque microenvironment may induce

structural changes in free hemoglobin, increasing T lymphocyte infiltration, expanding cytokine production and carrying on the inflammatory milieu (12).

The role of MMPs on the events that lead to plaque instability has been extensively explored by several groups of investigators, particularly in experimental and pathological studies that have demonstrated enhanced expression and matrix degrading activity of these enzymes surrounding the fibrous cap in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques (14,15,30,31). However, few studies have evaluated the relationship between MMPs and IPH. Nikkari et al (31) have demonstrated more than a decade ago that there is a significant correlation between hemorrhage in the lipid core and positivity for MMP-1 expression by immunohistochemistry in a small study involving 20 endarterectomy specimens. Tziakas et al (32) have partially reproduced such findings demonstrating increased MMP-9 levels measured in tissue extracts of 7 patients with macroscopic gross evidence of IPH. In this latter study, however, serum levels of MMP-2, -9 and TIMP-1 were not predictive of IPH or neurological symptoms. In the present analysis, we could take the advantage of using non-invasive high resolution imaging techniques to identify *in vivo* IPH (13,23), prior to carotid endarterectomy. Our findings indicate that MMPs are not related to the degree of luminal stenosis in the carotid vasculature, but their serum levels, particularly levels of MMP-9, are associated to IPH evaluated by T1W carotid MRI, subsequently confirmed by histological analysis. Furthermore, elevated serum levels of MMP-9 were also observed in clinically unstable patients, defined by recent ipsilateral hemispheric neurological symptoms. This finding concurs

with data from a recent report from Eldrup et al (17) involving 207 patients with carotid stenosis that have demonstrated a 2-fold increased risk of ipsilateral stroke and cardiovascular death in those with elevated levels of MMP-9. Our data might provide the mechanistic insight why MMP-9 levels were predictive of neurological prognosis, suggesting that IPH may be related to the risk of future events. In addition, MMP-9 was the only independent serum predictor of IPH in our analysis, and lost its predictive value only when neurological symptoms were included in the multivariate model. These findings indicate that unstable carotid plaques characterized by IPH are directly related to a history of ischemic neurologic symptoms (33) and that MMP-9 is intrinsically implicated in the processes that characterize instability. Finally, a recent experimental study in rats suggested that MMP-9 promotes atheroma progression and thinning of the fibrous cap in intermediate atherosclerotic lesions, and is associated to IPH only in complex and advanced lesions (18), as those evaluated in our study and in the report from Eldrup et al (17).

Some methodological aspects of our study design deserve consideration. Our analysis was focused on radiological and histological IPH diagnosis, but we acknowledge that detailed analysis of the fibrous cap thickness and the collagen content could potentially add important information regarding the instability of atherosclerotic lesions. Other MMPs might also be involved in the degradation of matrix components of the atheroma, although MMP-1, -3 and -9 have been the ones that depicted the most consistent findings in previous reports. Finally, we



acknowledge that some of the trends observed in the current analysis might turn to be statistically significant if our sample size had been greater.

In conclusion, our results demonstrate that the presence of a hyperintense signal on high-resolution MRI of carotid arteries in patients undergoing carotid endarterectomy is associated with increased levels of MMP-9. This particular finding was not related to the degree of angiographic stenosis. These results, when viewed in light of evidence from other related investigations, are consistent with the concept that luminal stenosis in extracranial atherosclerotic disease is not an adequate marker of atheroma vulnerability.

## 6.6 REFERENCES

1. Hankey GJ. Stroke: How large a public health problem, and how can the neurologist help? *Arch Neurol* 1999;56:748-754.
2. Dollery CM, Libby P. Atherosclerosis and proteinase activation. *Cardiovasc Res* 2006;69:625-635.
3. Goldstein LB, Adams R, Alberts MJ, Appel LJ, Brass LM, Bushnell CD et al. Primary prevention of ischemic stroke: A guideline from the American Heart Association/ American Stroke Association Stroke Council. *Stroke* 2006;37:577-617.

4. Beneficial effect of carotid endarterectomy in symptomatic patients with high-grade carotid stenosis. North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial Collaborators. *N Engl J Med* 1991;325:445-453.
5. Endarterectomy for asymptomatic carotid artery stenosis. Executive Committee for the Asymptomatic Carotid Atherosclerosis Study. *JAMA* 1995;273:1421-1428.
6. Randomised trial of endarterectomy for recently symptomatic carotid stenosis: final results of the MRC European Carotid Surgery Trial (ECST). *Lancet* 1998;351:1379-1387.
7. Ross R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115-126.
8. Shah PK. Plaque disruption and thrombosis: potential role of inflammation and infection. *Cardiol Rev* 2000;8:31–39.
9. 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.

10. Libby P. Molecular bases of the acute coronary syndromes. *Circulation* 1995; 91:2844-2850.
11. Kolodgie FD, Gold HK, Burke AP, Fowler DR, Kruth HS, Weber DK, et al. Intraplaque hemorrhage and progression of coronary atheroma. *N England J Med* 2003;349:2316 –2325.
12. Buttari B, Profumo E, Petrone L, Pietraforte D, Siracusano A, Margutti P, et al. Free hemoglobin: a dangerous signal for the immune system in patients with carotid atherosclerosis? *Ann N Y Acad Sci* 2007;1107:42-50.
13. Albuquerque LC, Narvaes L, Maciel AA, Staub H, Friedrich M, Filho JR, et al. Intraplaque hemorrhage assessed by high-resolution magnetic resonance imaging and C-reactive protein in carotid atherosclerosis. *J Vasc Surg* 2007;46:1130-1137.
14. 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.
15. 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.

16. Alvarez B, Ruiz C, Chacón P, Alvarez-Sabin J, 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.
17. 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.
18. de Nooijer R, Verkleij CJ, von der Thusen JH, Jukema JW, van der Wall EE, van Berkel TJ, et al. Lesional overexpression of matrix metalloproteinase-9 promotes intraplaque hemorrhage in advanced lesions but not at earlier stages of atherogenesis. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 2006;26:340-346.
19. Barnett HJM, Taylor DW, Eliasziw M, Fox AJ, Ferguson GG, Haynes RB et al, for the North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial Collaborators. Benefit of carotid endarterectomy in patients with symptomatic moderate or severe stenosis. *N Engl J Med* 1998;339:1415-1425.
20. 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.

21. 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.
22. 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.
23. Moody AR, Murphy RE, Morgan PS, Martel AL, Delay GS, Alder S et al. Characterization of complicated carotid plaque with magnetic resonance: direct thrombus imaging in patients with cerebral ischemia. *Circulation* 2003;107:3047-3052.
24. Whicher JT, Ritchie RF, Johnson AM, Baudner S, Bienvenu J, Blirup-Jensen S et al. New international reference preparation for proteins in human serum (RPPHS). *Clin Chem* 1994;40:934-938.
25. Lovett JK, Redgrave JNE, Rothwell PM. A critical appraisal of the performance, reporting, and interpretation of studies comparing carotid plaque imaging with histology. *Stroke* 2005;36:1091–1097.

26. Lusby RJ, Ferrell LD, Ehrenfeld WK, Stoney RJ, Wylie EJ. Carotid plaque hemorrhage. Its role in production of cerebral ischemia. *Arch Surg* 1982;117:1479-1488.
27. 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.
28. 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 Thromb Vasc Biol* 2005;25:2054-2061.
29. Virmani R, Ladich ER, Burke AP, Kolodgie FD. Histopathology of carotid atherosclerotic disease. *Neurosurgery* 2006;59:219-227.
30. Rohde LE, Lee RT. Pathophysiology of atherosclerotic plaque development and rupture: an overview. *Semin Vasc Med* 2003;3:347-354.
31. Nikkari ST, O'Brian KD, Ferguson M, Hatsukami T, Welgus HG, Alpers CE, Clowers AW. Interstitial collagenase (MMP-1) expression in human carotid atherosclerosis. *Circulation* 1995;92:1393-1398.

32. Tziakas DN, Lazarides MK, Tentes IK, Georgiadis GS, Eleftheriadou E, Chalikias GK et al. 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.
  
33. Albuquerque LC, Rohde LE. Correlation between carotid intraplaque hemorrhage and clinical symptoms. *Stroke* 2008;39:e84.

Table 1. Clinical characteristics according to the presence of hyperintense signal on MRI

	All N=82	With Hyperintense Signal N=48	Without Hyperintense Signal N=34	p value
Age, years	67 ± 9	67 ± 10	67 ± 9	0.81
Male gender, n (%)	54 (66)	32 (67)	22 (65)	0.85
Active smoking, n (%)	17 (21)	8 (17)	9 (26)	0.42
Hypertension, n (%)	73 (89)	43 (90)	30 (88)	>0.999
Diabetes, n (%)	28 (34)	17 (35)	11 (32)	0.77
Obesity, n (%)	19 (23)	13 (27)	6 (18)	0.31
Previous stable angina, n (%)	14 (17)	8 (17)	6 (18)	0.90
Previous MI, n (%)	10 (12)	5 (10)	5 (15)	0.73
Previous CABG, n (%)	13 (16)	9 (19)	4 (12)	0.54
Peripheral artery disease, n (%)	33 (40)	22 (46)	11 (32)	0.22
AF, n (%)	3 (4)	3 (6)	0	0.26
SBP, mmHg	133 ± 16	134 ± 17	132 ± 16	0.64
DBP, mmHg	79 ± 10	80 ± 10	79 ± 10	0.66
Total cholesterol, mg/dL	167 ± 45	170 ± 50	163 ± 38	0.51
HDL cholesterol, mg/dL	41 ± 13	43 ± 16	38 ± 7	0.07
LDL cholesterol, mg/dL	97 ± 42	98 ± 46	95 ± 36	0.81
Triglycerides, mg/dL	174 ± 100	178 ± 110	168 ± 86	0.67
Statin therapy, n (%)	72 (88)	44 (92)	28 (82)	0.30
Antiplatelet agents, n (%)	56 (68)	35 (73)	21 (62)	0.28



MI – myocardial infarction; CABG – coronary artery bypass graft; AF – atrial fibrillation; SBP – systolic blood pressure; DBP – diastolic blood pressure; LDL – low-density lipoprotein; HDL – high-density lipoprotein.

Table 2. Serum markers and intraplaque hemorrhage by histological analysis

Serum Marker	Acute or Recent	Remote or Absent	p value
	IPH	IPH	
Leukocytes	7876 ± 2016	7925 ± 2481	0.92
Total cholesterol (mg/dL)	169 ± 50	163 ± 37	0.56
hs-CRP (mg/dL)	1.4 ± 2.5	0.6 ± 0.8	0.04
MMP-1 (ng/mL)	4.1 ± 2.9	3.4 ± 1.7	0.05
MMP-3 (ng/mL)	9.1 ± 6.2	9.7 ± 5.5	0.10
MMP-9 (ng/mL)	244 ± 173	157 ± 102	0.007

Data expressed as mean ± standard deviation. Statistical analyses were based on log hs-CRP, log MMP-1, square root of MMP-3 and non-transformed values of MMP-9.

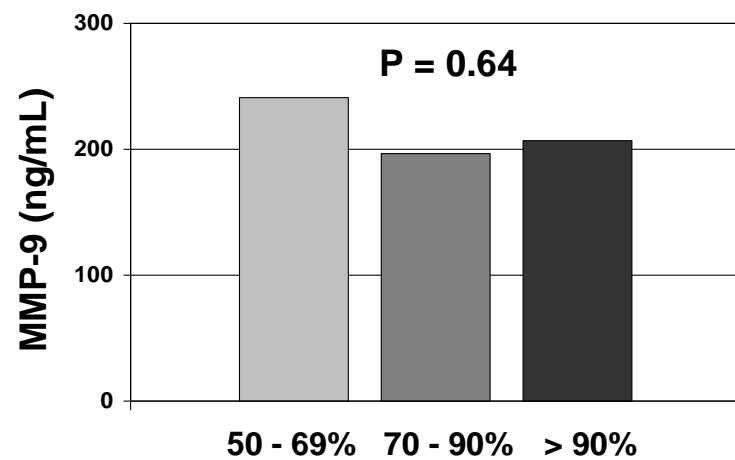
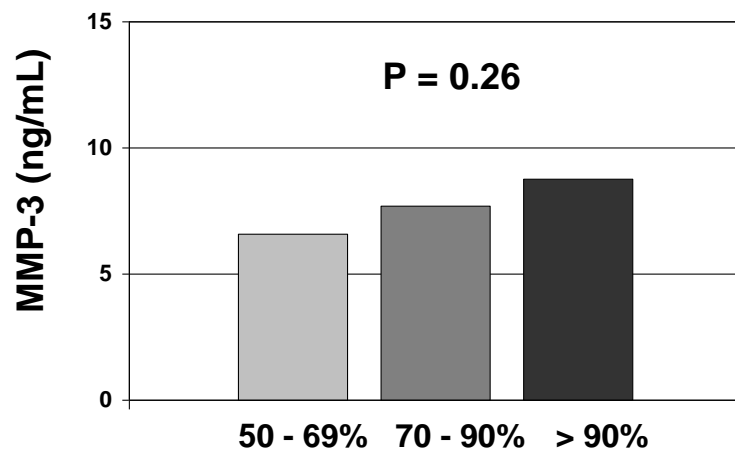
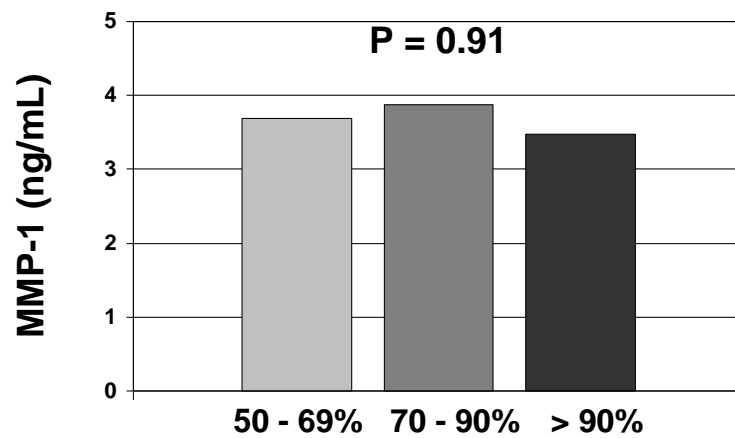
hs-CRP – high-sensitivity C-reactive protein

MMP – matrix metalloproteinase

**FIGURE LEGENDS**

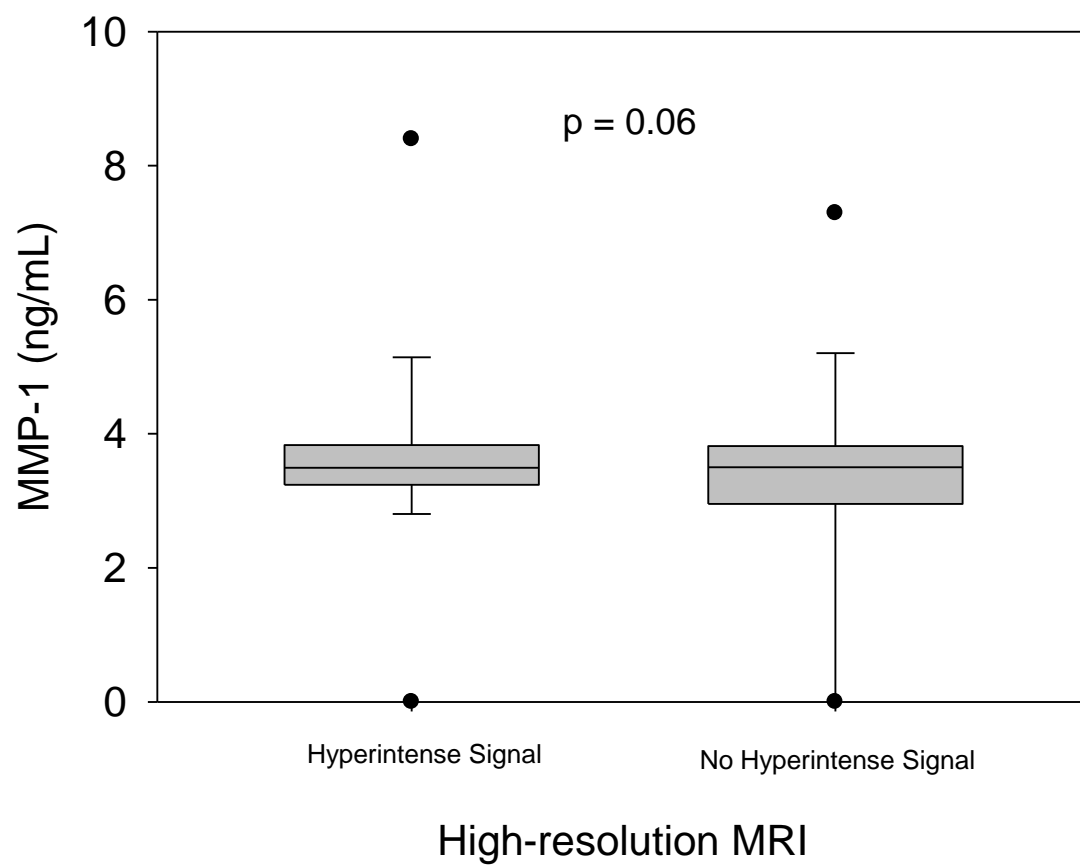
**Figure 1.** Metalloproteinases according to luminal stenosis levels in the carotid vasculature in patients who underwent carotid endarterectomy.

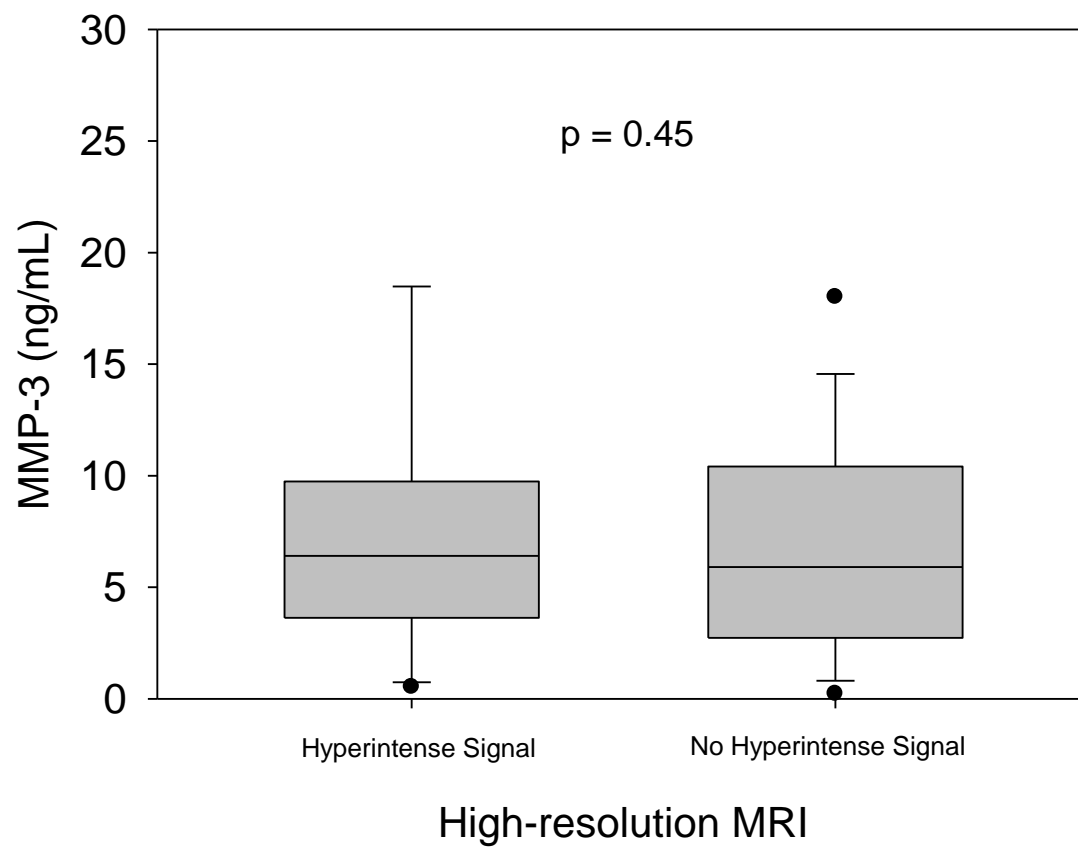
**Figure 2.** MMP-1 (A), MMP-3 (B) and MMP-9 (C) levels in patients with or without the hyperintense signal in high-resolution MRI.



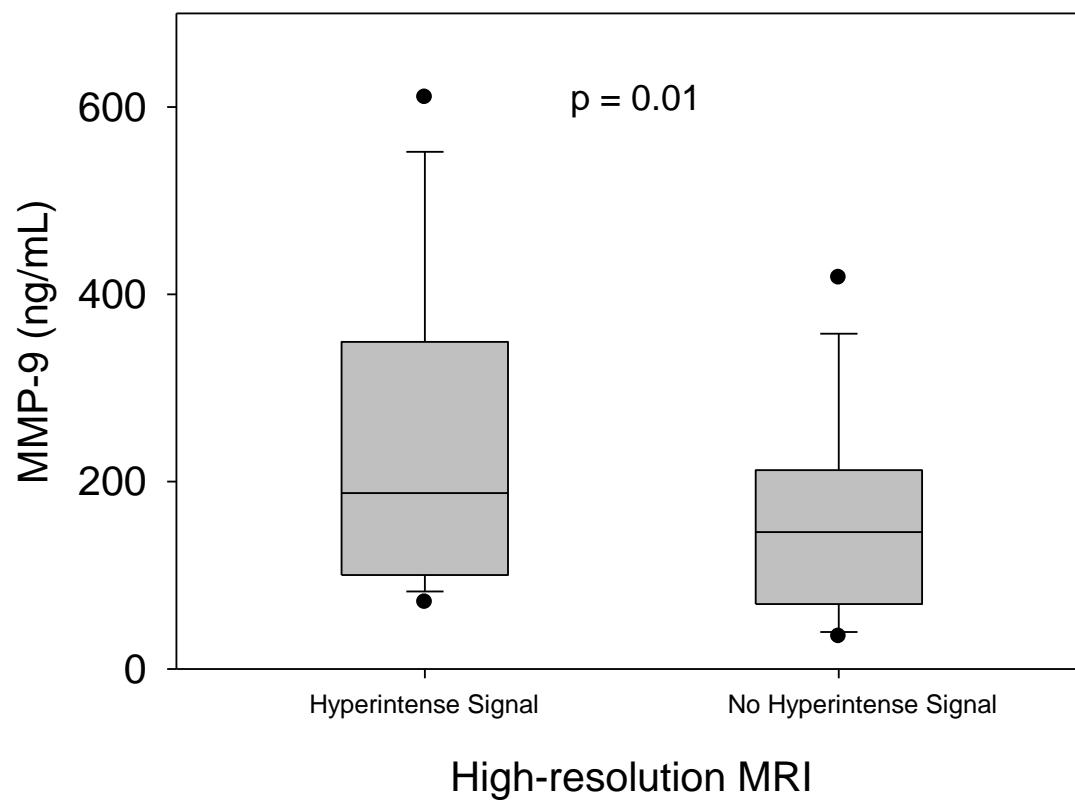
**Carotid Luminal Stenosis**

A



**B**

C



## 7 ANEXOS

## 7.1 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 sangüíneo 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

## 7.2 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) ACP-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 Progressiva:

(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

### 7.3 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

**7.4 FICHA LABORATORIAL**

N°

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

## 7.5 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

## 7.6 FICHA HISTOLÓGICA

N°

### HEMORRAGIA INTRAPLACA:

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