



**ASSOCIAÇÃO ENTRE HEMORRAGIA INTRAPLACA
AVALIADA POR RESSONÂNCIA NUCLEAR MAGNÉTICA
DE ALTA RESOLUÇÃO E CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS,
HISTOPATOLÓGICAS E SÉRICAS DE PACIENTES
SUBMETIDOS A ENDARTERECTOMIA CAROTÍDEA**

Luciano Cabral Albuquerque

**FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE:
CARDIOLOGIA E CIÊNCIAS CARDIOVASCULARES**

TESE DE DOUTORADO

Agosto de 2006

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

**ASSOCIAÇÃO ENTRE HEMORRAGIA INTRAPLACA
AVALIADA POR RESSONÂNCIA NUCLEAR MAGNÉTICA
DE ALTA RESOLUÇÃO E CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS,
HISTOPATOLÓGICAS E SÉRICAS DE PACIENTES
SUBMETIDOS A ENDARTERECTOMIA CAROTÍDEA**

TESE DE DOUTORADO

LUCIANO CABRAL ALBUQUERQUE

Porto Alegre

2006

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

**ASSOCIAÇÃO ENTRE HEMORRAGIA INTRAPLACA
AVALIADA POR RESSONÂNCIA NUCLEAR MAGNÉTICA
DE ALTA RESOLUÇÃO E CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS,
HISTOPATOLÓGICAS E SÉRICAS DE PACIENTES
SUBMETIDOS A ENDARTERECTOMIA CAROTÍDEA**

LUCIANO CABRAL ALBUQUERQUE

ORIENTADOR: Prof. Dr. Luis Eduardo Rohde

*Tese de Doutorado apresentada no
Programa de Pós-Graduação em
Cardiologia e Ciências
Cardiovasculares da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul para
obtenção do título de Doutor.*

Porto Alegre

2006

A345a Albuquerque, Luciano Cabral

Associação entre hemorragia intraplaca avaliada por ressonância nuclear magnética de alta resolução e características clínicas, histopatológicas e séricas de pacientes submetidos a endarterectomia carotídea / Luciano Cabral Albuquerque; orient. Luis Eduardo Rohde. Porto Alegre: UFRGS, 2006.

165 f.: il. tab.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Cardiologia e Ciências Cardiovasculares.

1. ENDARTERECTOMIA DAS CARÓTIDAS. 2. DOENÇAS DAS ARTÉRIAS CARÓTIDAS. 3. ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA. 4. INFLAMAÇÃO/imunologia. 5. HEMORRAGIA. 6. PROTEÍNA C-REATIVA. 7. ATROSCLEROSE CORONÁRIA. 8. ESTENOSE DAS CARÓTIDAS. 9. ESTUDOS TRANSVERSAIS. I. Rohde, Luis Eduardo . II. Título.

C.D.D. 616.136

C.D.U. 616.133-005.1:617(043.3)

N.L.M. WG 170

DEDICATÓRIA

***Esta Tese é dedicada a Janaína e Giulia,
razão de todo este esforço.***

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao Prof. Dr. Luis Eduardo Rohde, pela excepcional oportunidade de ser seu orientando, pela excelência científica colocada a meu dispor em todas as fases deste estudo, e pelas consistentes orientações.

Ao Curso de Pós-graduação em Ciências Cardiovasculares da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em especial à Prof.^a Dra. Nadine Claussel e ao Prof. Dr. Waldomiro Manfrói, pela afetuosa acolhida, pelo elevado convívio de uma década, e pelos ensinamentos que me permitiram alcançar o que, ao início, parecia-me inatingível.

À Direção do Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, pelo incondicional apoio que tornou possível a concretização deste trabalho.

Aos meus familiares e amigos, pelo constante estímulo ao meu aperfeiçoamento, e pela singular oportunidade de crescimento, em suas companhias.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Luciane Barreneche Narvaes, pela inestimável ajuda na elaboração do projeto de pesquisa, e na coleta e interpretação dos dados.

Ao Prof. Dr. João Rubião Hoefel Filho, pela incansável colaboração no desenvolvimento e na execução dos modelos de Ressonância Nuclear Magnética, aqui aplicados.

Ao Prof. Dr. Henrique Staub, pela valiosa ajuda na metodologia científica, e na utilização dos auto-anticorpos.

Ao Prof. Dr. Carlos Luiz Reichel, pelo fundamental auxílio na viabilização das análises histológicas.

Ao Dr. Aluisio Antunes Maciel, pela prestimosa análise histológica das placas de ateroma.

Ao Dr. Maurício Barreira Marques, pela valorosa contribuição na leitura das imagens de Ressonância Nuclear Magnética.

Ao físico Maurício Anes, pela determinada ajuda na estruturação do modelo de Ressonância Nuclear Magnética.

Ao Dr. Maurício Friedrich, pela competente avaliação clínico-neurológica dos participantes do estudo.

À Inova Diagnostics, Inc., San Diego, EUA, em especial ao bioquímico Gary Norman , pela colaboração nos testes sorológicos de auto-anticorpos.

Ao Dr. Marco Antonio Goldani, pelo precioso apoio na incorporação deste protocolo à prática assistencial do Hospital São Lucas da PUCRS.

Aos colegas do Serviço de Cirurgia Cardiovascular do Hospital São Lucas da PUCRS, pela compreensão nos momentos em que estive ausente, dedicando-me a este projeto.

Aos funcionários do Laboratório de Ressonância Nuclear Magnética do Hospital São Lucas da PUCRS, pela permanente disponibilidade em atender as demandas deste estudo.

Aos funcionários do Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital São Lucas da PUCRS, pela substancial colaboração no árduo trabalho de preparação das lâminas de histologia.

Aos funcionários do Laboratório de Patologia Clínica do Hospital São Lucas da PUCRS, pelo apoio logístico na coleta e armazenagem das alíquotas sorológicas.

À funcionária Sirlei Ferreira Reis, Secretária do Curso de Pós-graduação em Ciências Cardiovasculares da UFRGS, pela meritória postura de integração dos corpos discente e docente, ao longo destes anos.

À funcionária Sra. Rosa Homem, do Serviço de Cardiologia do Hospital São Lucas da PUCRS, pela qualificada formatação editorial do trabalho.

Ao funcionário Giquitibá Moraes de Melo, da Faculdade de Medicina da PUCRS, pelo eficiente trabalho de editoração gráfica dos resultados.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	IV
AGRADECIMENTO ESPECIAL.....	V
AGRADECIMENTOS.....	VI
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XI
LISTA DE TABELAS.....	XIII
LISTA DE FIGURAS.....	XIV
ARTIGO DE REVISÃO I.....	16
Introdução.....	18
Aspectos Epidemiológicos.....	19
Aspectos Clínicos e Indicações de Intervenção.....	22
A. Pacientes Sintomáticos.....	23
B. Pacientes Assintomáticos.....	25
Aterosclerose e Inflamação.....	28
Referências Bibliográficas.....	34
ARTIGO DE REVISÃO II.....	44
Introdução.....	46
Marcadores Sorológicos.....	48
Agentes Infecciosos.....	55
Papel dos Auto-anticorpos.....	57
Aspectos Morfológicos do Ateroma na Doença Carotídea.....	61
Conclusão.....	69
Referências Bibliográficas.....	71
ARTIGO ORIGINAL EM PORTUGUÊS.....	90
Resumo.....	92
Introdução.....	94
Métodos.....	96
Pacientes.....	96
Caracterização Clínica.....	96
Ressonância Nuclear Magnética.....	97
Marcadores Séricos.....	98
Técnica Cirúrgica.....	99
Análise Histológica.....	100
Correlação entre Achados de RNM e Histologia.....	101
Análise Estatística.....	101
Resultados.....	102
Características dos Pacientes.....	102
Achados da RNM.....	103
Achados Histopatológicos e Correlação com RNM.....	104
Marcadores Séricos Imunoinflamatórios.....	104
Discussão.....	105
Referências Bibliográficas.....	115

ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS	122
Summary	124
Introduction	126
Methods	128
Patients.....	128
Clinical Characterization	128
Magnetic Nuclear Resonance.....	129
Serum Immunoinflammatory Markers.....	130
Surgical Technique	131
Histological Analysis.....	131
Correlation between MRI Findings and Histology	133
Statistical Analysis.....	133
Results.....	134
Patients Characteristics	134
MRI Findings.....	135
Histopathological Findings and Correlation to MRI.....	135
Immunoinflammatory Serum Markers.....	136
Discussion	137
References	147
ANEXOS	154
Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.....	155
Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	156
Ficha de Avaliação Clínica.....	159
Ficha Neurológica.....	160
Ficha Laboratorial	161
Ficha Angiográfica	162
Análise Histológica.....	163
Carta de Aceitação nº 1 RBCCV.....	164
Carta de Aceitação nº 2 RBCCV.....	165

LISTA DE ABREVIATURAS

DOC	doença obstrutiva cerebrovascular
AVE	acidente vascular encefálico
EC	endarterectomia de carótida
AIT	ataque isquêmico transitório
≥	igual ou maior
<	menor
AAS	ácido acetilsalicílico
LDL	lipoproteína de baixa densidade
LDL –OX	LDL oxidado
PCR	proteína C reativa
PCR-us	proteína C reativa ultrasensível
MCP-1	fator quimiotático de monócitos
IL	interleucina
CD40 L	CD40 ligante
MMP	metaloproteinase
COX	ciclooxigenase
TNF	fator de necrose tumoral
PDGF	fator de crescimento plaquetário
FGF	fator de crescimento fibroblástico
CML	células musculares lisas
SCA	síndrome coronariana aguda
IAM	infarto agudo do miocárdio
g	grama

mg	miligrama
Kg	quilograma
ml	mililitro
dL	decilitro
mm	milímetro
cm	centímetro
μ	micra
μm	micrômetro
IgG	imunoglobulina G
IgA	imunoglobulina A
IgM	imunoglobulina M
HsP	proteína de choque térmico
r	coeficiente de correlação de Pearson
k	coeficiente kappa
US	ultrassonografia
RNM	ressonância nuclear magnética
TOF	<i>time of flight</i>
PDW	densidade de prótons
FOV	campo de visão quadrado
HE	hematoxilina-eosina
TM	tricrômico de Mallory

LISTA DE TABELAS

ARTIGO DE REVISÃO I

Tabela 1	Indicações atuais de endarterectomia carotídea.....	28
Tabela 2	Processos inflamatórios da disfunção endotelial, formação da placa aterosclerótica e principais efeitos biológicos.....	33

ARTIGO DE REVISÃO II

Tabela 1	Métodos de imagem e vulnerabilidade da doença carotídea	68
----------	---	----

ARTIGO ORIGINAL EM PORTUGUÊS

Tabela 1	Características Clínicas dos Pacientes	111
----------	--	-----

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO DE REVISÃO I

Figura 1	Patogênese da placa aterosclerótica: A) lesão inicial; B) remodelamento positivo e afilamento da capa fibrosa; C) Ruptura da capa fibrosa sem hemorragia intraplaca; D) Hemorragia intraplaca determinando ruptura da capa fibrosa	32
----------	--	----

ARTIGO DE REVISÃO II

Figura 1	A1) Paciente assintomático com estenose de 90%; A2) ausência de sinal hiperintenso na seqüência ponderada em T1; B1) paciente com amaurose fugaz há 1 semana, e estenose de 90%; B2) sinal hiperintenso demonstrando hemorragia intraplaca na carótida interna (seta).....	66
----------	--	----

ARTIGO ORIGINAL EM PORTUGUÊS

Figura 1	Correlação entre presença de sinal hiperintenso na ressonância nuclear magnética do sistema carotídeo e sintomas neurológicos	112
Figura 2	Associação entre presença de sinal hiperintenso e grau angiográfico de estenose, avaliados por ressonância nuclear magnética do sistema carotídeo.....	112
Figura 3	Ausência de sinal hiperintenso na ressonância nuclear magnética nos cortes sagital (A) e axial (B). Análise histológica demonstrando ausência de hemorragia em hematoxilina e eosina (C e D).....	113

Figura 4	Presença de sinal hiperintenso na ressonância nuclear magnética nos cortes sagital (A) e axial (B). Análise histológica demonstrando presença de hemorragia em hematoxilina e eosina (C e D).....	113
Figura 5	Distribuição dos níveis de Proteína C Reativa Ultra-Sensível nos diferentes graus de estenose carotídea (A) e de acordo com características clínicas e presença de sinal hiperintenso na ressonância nuclear magnética (B)	114

ARTIGO DE REVISÃO I

**Vulnerabilidade da Doença Aterosclerótica de Carótidas:
do Laboratório à Sala de Cirurgia - Parte I (*)**

**Vulnerability of Atherosclerotic Carotid Disease: from Laboratory to
Operating Room – Part I**

Dr. Luciano Cabral Albuquerque ¹

Dra. Luciane Barreneche Narvaes ¹

Dr. Alúcio Antunes Maciel ²

Dr. Henrique Staub ³

Dr. Maurício Friedrich ⁴

Dr. João Rubião Hoefel Filho ⁵

Dr. Maurício Anes⁵

Dr. Luis Eduardo Rohde ⁶

- ✓ **Serviços de Cirurgia Cardiovascular¹, Patologia², Reumatologia³, Neurologia⁴ e Centro de Diagnóstico por Imagem⁵ do Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.**
- ✓ **Serviço de Cardiologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre⁶.**
- ✓ **Programa de Pós-Graduação em Cardiologia e Ciências Cardiovasculares da Universidade Federal do Rio Grande do Sul^{1,6}**

**(*) Publicado na Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular 2006;
21(2):127-135.**

INTRODUÇÃO

A doença obstrutiva cerebrovascular (DOC) representa atualmente uma prioridade em saúde pública nos países desenvolvidos, devido à expressiva prevalência na população adulta, à gravidade dos eventos isquêmicos e ao alto potencial de incapacitação da vida produtiva^{1,2}. Cerca de 30% de todos os casos de acidente vascular encefálico (AVE) podem ser atribuídos à doença aterosclerótica da bifurcação carotídea, pelos mecanismos de trombose aguda, ou mais comumente de embolização distal^{3,4}.

A despeito dos significativos avanços ocorridos na terapia medicamentosa da DOC, a endarterectomia de carótida (EC) permanece como importante medida de profilaxia do AVE, e tratamento de eleição nas lesões obstrutivas graves, mesmo na ausência de sintomas hemisféricos ipsilaterais^{5,6}. Enquanto nos anos 70 a EC popularizou-se enormemente como método preferencial de tratamento da isquemia cerebral, somente nos anos 80 e 90, a partir dos resultados de vários ensaios clínicos, foi possível a determinação precisa dos subgrupos de pacientes que realmente se beneficiavam da estratégia cirúrgica. Estes achados resultaram no estabelecimento das indicações consensuais vigentes de EC, baseadas exclusivamente no percentual de estenose^{7,8}.

Entretanto, o conceito de vulnerabilidade da placa aterosclerótica, inicialmente introduzido na doença obstrutiva coronária, revela que lesões vulneráveis são caracterizadas pela presença de necrose no núcleo da placa, de sítios com grande conteúdo lipídico e pouco celularizados, de áreas de hemorragia intraplaca, de afilamento da capa fibrosa, e de crescimento

excêntrico, um fenômeno denominado remodelamento positivo^{9,10}. Os eventos isquêmicos são determinados pela ruptura da capa fibrosa, que expõe o conteúdo trombogênico da placa ao contato com o sangue, e independem do grau de estenose ou da significância hemodinâmica das lesões^{11,12}.

A evidência do envolvimento de mecanismos inflamatórios na aterosclerose, tem contribuído para a modificação de paradigmas etiopatogênicos, substituindo-se o modelo tradicional do acúmulo progressivo e concêntrico de lipídeos na parede arterial, pelo conceito de que a inflamação desempenha um papel central na formação e progressão do ateroma.

A parte I desta revisão tem o propósito de analisar os estudos recentes e de relevância, relacionados à vulnerabilidade na doença aterosclerótica de artérias carótidas, expressa em seus aspectos epidemiológicos, clínicos, e inflamatórios. Na parte II, serão abordados os marcadores séricos de uso corrente, bem como aspectos histológicos, e de diagnóstico por imagem, relativos à instabilidade da doença carotídea, discutindo-se possíveis implicações terapêuticas, ou eventuais modificações de critérios relacionados às indicações atuais de intervenção.

Aspectos Epidemiológicos

Nos países desenvolvidos, o AVE constitui a terceira causa mais comum de morte na população adulta, e o determinante mais freqüente de invalidez permanente¹³. Estima-se uma incidência de 0,2 a 0,3% na população geral, o que representa cerca de 700.000 novos casos a cada ano nos Estados Unidos, dos quais 1/3 evoluem para óbito durante o primeiro ano, 1/3 tornam-se incapacitados para a vida produtiva e apenas o 1/3 restante alcança a

reabilitação¹⁴. A taxa de mortalidade na fase hospitalar, descrita como em torno de 25%, é significativamente maior nos pacientes do sexo feminino, e naqueles com idade superior a 75 anos¹⁵.

Entre os sobreviventes, a taxa relatada de recorrência de eventos isquêmicos cerebrais tem sido tão alta quanto 9% ao ano, e a sobrevida em 5 anos não superior a 50%¹⁶. Enquanto a mortalidade do primeiro AVE recorrente é semelhante a do evento inicial, aquela observada na fase hospitalar dos episódios recorrentes subseqüentes é superior a 60%. Dados do estudo de *Framingham*¹⁷ demonstram que a incidência de infarto cerebral duplica a cada década na população com idade superior a 55 anos, chegando a 1700 casos por 100000 habitantes ao ano após os 75 anos, com o dobro de mortalidade nas mulheres em relação aos homens. O grande impacto clínico destes dados epidemiológicos torna esta doença mundialmente prioritária nas políticas de saúde pública.

A ateromatose da bifurcação carotídea é a causa de 25% dos casos de infarto cerebral, e importante fator de prevenção primária e secundária do AVE¹⁸. Além disso, a prevalência documentada de estenose assintomática igual ou superior a 50%, nos adultos após 65 anos, tem oscilado entre 7 a 10% nos homens e entre 5 a 7% nas mulheres¹⁹, embora a ocorrência de estenose inferior a 49% seja 10 vezes mais freqüente²⁰.

A EC tem se afirmado como procedimento cirúrgico de escolha, na prevenção do AVE, ou da recorrência de eventos isquêmicos, sobretudo em subgrupos de risco²¹. Durante os anos de 1980 a 1993, a média anual de EC realizadas em mais de 6000 hospitais americanos, registrados no *National Hospital Discharge Survey*, foi de 81000, tendo havido um pico de 107000

cirurgias em 1985. Na população com idade acima de 65 anos, realizaram-se 196 procedimentos para cada 100.000 habitantes/ano, o que fez da EC a cirurgia de grande porte mais frequentemente realizada nos EUA, no período analisado²². Bravata e cols estudaram a evolução tardia de 5123 pacientes admitidos por doença cerebrovascular, e demonstraram que, nos pacientes que foram submetidos à EC, a taxa de mortalidade em 5 anos foi de 38%, significativamente menor que a observada nos casos de AVE não operados (60%)²³.

O impacto dos custos hospitalares decorrentes dos eventos cerebrovasculares tem sido alvo de preocupação mundial, já que, por exemplo, as internações por AVE consomem 4% de todo orçamento para a saúde nos EUA, 5.5% na Escócia e 3% na Holanda^{24,25,26,27}. Na Inglaterra, embora apenas 55% dos pacientes com isquemia cerebral efetivamente sejam internados, o AVE compreende 2% de todas as altas, ocupa 7% dos leitos disponíveis para adultos e é responsável por 6% de todas as despesas hospitalares². Smurawska e cols, estudando 285 casos consecutivos de AVE tratados ao longo de 24 meses, observaram um custo médio de U\$ 21150 por paciente, e um custo total de U\$ 6.6 milhões²⁸. Uma análise de custo intra-hospitalar, realizada em 137 hospitais comunitários dos EUA, com 18740 casos de infarto cerebral, e 7861 casos de isquemia transitória, apontou um custo médio de U\$ 5837 e U\$ 3350 por internação, respectivamente²⁹.

No contexto epidemiológico, as medidas já consagradas que visam diminuir o impacto das doenças cerebrovasculares, incluem o tratamento otimizado do AVE agudo, o controle dos fatores de risco para aterosclerose, a efetiva prevenção primária (medicamentosa ou cirúrgica) dos subgrupos de

risco, e a prevenção de eventos recorrentes. Entretanto, estudos testando métodos laboratoriais ou de imagem, potencialmente capazes de detectar a instabilidade da placa de carótida, e sua suscetibilidade a eventos clínicos, antes da ocorrência do infarto cerebral, poderão também contribuir para a melhoria do atual cenário.

Aspectos Clínicos e Indicações de Intervenção

Na doença obstrutiva de carótida, os sintomas geralmente estão relacionados à ocorrência de macro ou microembolizações, que resultam em isquemia territorial. A magnitude dos quadros isquêmicos dependerá de mecanismos compensatórios, relacionados ao estado hemodinâmico geral do paciente e dos ramos colaterais a partir do polígono de *Willis*. O quadro pode instalar-se de maneira abrupta e catastrófica, ou de forma sutil e insidiosa, que dificulta até mesmo ao paciente o reconhecimento das manifestações. 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. Embora raros, sintomas como tontura, vertigem, alterações posturais ou síncope podem ocorrer, e geralmente sugerem comprometimento concomitante do território vértebro-basilar. Nos extremos do amplo espectro clínico da doença cerebrovascular, podemos encontrar desde queixas como formigamento leve e recidivante da mão, até um quadro de hemiplegia súbita e irreversível³⁰.

Classicamente, a nomenclatura das síndromes isquêmicas cerebrais leva em consideração a reversibilidade e o tempo de evolução do déficit neurológico. Quando a síndrome clínica apresenta reversão completa em até 24 horas, sem deixar seqüelas, denomina-se **ataque isquêmico transitório** (AIT), o qual apresenta um risco de 30% de recorrência, ou de evolução para AVE. Se não existe reversão neste período, pode-se caracterizar o **infarto cerebral**, independentemente da recuperação futura, ou do grau de seqüela neurológica. Entretanto, atualmente, esta divisão tem sido flexibilizada, pela possibilidade de documentação de mínimas áreas de lesão tecidual. Nos EUA, estima-se que a inclusão da ressonância nuclear magnética de difusão cerebral na abordagem inicial dos eventos cerebrovasculares, deverá resultar em redução da taxa anual de AITs na ordem de 33%, e aumento de 7% na incidência de infarto cerebral³¹. Enquanto nos casos de AIT, a endarterectomia pode ser realizada em qualquer momento a partir do diagnóstico, em casos de AVE há necessidade de pelo menos 2 a 3 semanas até a intervenção, pelos risco de hemorragia intracerebral grave, motivo pelo qual a cirurgia no AVE agudo é habitualmente contra-indicada³².

A eficácia da EC para prevenção de novos eventos cerebrais, em pacientes com estenose sintomática ou assintomática, tem sido comprovada em diversos ensaios clínicos, com indicações atuais de intervenção bem definidas, baseadas principalmente no percentual de estenose.

A. Pacientes Sintomáticos

Em pacientes sintomáticos, a EC pode ser realizada com o objetivo de impedir o AVE quando a expressão clínica é o ataque isquêmico transitório

(AIT), ou com o objetivo de salvar parênquima cerebral sob risco de novo infarto, e restaurar a qualidade de vida, nos casos de AVE já estabelecido. Dos diversos ensaios clínicos que têm procurado comparar os resultados da intervenção cirúrgica com o tratamento farmacológico, dois atualmente consubstanciam o consenso internacional, o *North American Syntomatic Carotid Endarterectomy Trial (NASCET)* e o *European Carotid Surgery Trial (ECST)*.

No estudo *NASCET*, publicado em 1991, pacientes com estenose de carótida \geq do que 70% à angiografia, que haviam sofrido isquemia transitória ou AVE não incapacitante nos últimos 120 dias, foram randomizados para receberem terapia antiagregante plaquetária associada ou não à 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%⁷. Recentemente, os pesquisadores do *NASCET* publicaram os resultados da EC em pacientes com estenose carotídea considerada moderada, entre 30 e 69%. Nos casos de obstruções entre 30 e 49% nenhum benefício foi acrescentado com a intervenção cirúrgica, em relação à terapia medicamentosa, mas em pacientes com estenose entre 50 e 69%, houve um benefício estatisticamente significativo no grupo da EC, embora de menor magnitude do que o observado nos indivíduos com estenose grave. A redução do risco absoluto de AVE ipsilateral com a EC foi de 4,4% em 90 dias ($p = 0,045$), mantendo-se este benefício em 8 anos de seguimento, o que justifica o procedimento, desde que a taxa acumulada de AVE e óbito intra-hospitalar não exceda aos 3% descritos³³.

No estudo *ECST*, que incluiu pacientes sintomáticos com estenose também \geq do que 70%, 1811 casos alocados para estratégia cirúrgica, apresentaram redução relativa de risco de 84% para os desfecho AVE maior, comparados aos 1213 pacientes tratados clinicamente ($p < 0,001$), com maior benefício em estenoses superiores a 80%, e em homens, comparados às mulheres. Entretanto, o método de determinação do percentual de estenose foi diferente do utilizado no ensaio *NASCET*, superestimando a gravidade das lesões. Obstruções de 80% pelos critérios *ECST* equivaleriam a aproximadamente 60% de acordo com o *NASCET*³⁴. Em adição, a análise final do estudo *ECST* também demonstrou o benefício da EC no grupo de pacientes com estenose estimada entre 50% e 69% à angiografia, e resultados na verdade piores do que a terapia antiplaquetária nas lesões menores que 30%, devendo a intervenção, nestes casos, ser contra-indicada^{35,36}.

De interesse, o resultado dos ensaios *NASCET* e *ESCT* corroborou os achados do *Veterans Affairs Cooperative Study*, que, estudando 189 casos sintomáticos, com estenose igual ou superior a 50%, observou uma redução absoluta de risco na ordem de 11% nos pacientes submetidos à EC. Este benefício elevou-se para 17%, quando analisado somente o subgrupo com estenose \geq do que 70% ($p=0.004$)³⁷.

B. Pacientes Assintomáticos

Nos casos de doença obstrutiva assintomática de carótidas, é difícil determinar com precisão o número de AVEs que podem ser evitados pela EC na população geral. É estimado que aproximadamente 4% da população americana com idade entre 50 e 75 anos, apresentam estenose carotídea entre

60 e 99%, sem manifestações de isquemia. Supondo-se que estas pessoas pudessem ser identificadas e submetidas à EC, a taxa de AVE poderia ser potencialmente reduzida de 11% para 5%, em 5 anos, evitando-se em torno de 120 casos de AVE, para cada 10000 pacientes, a cada ano, o que seria uma medida benéfica de prevenção, ainda que elevado contingente de pacientes tivesse de ser operado para impedir um AVE³.

Os mais importantes ensaios clínicos que testaram a eficácia da EC em pacientes assintomáticos são o *Asymptomatic Carotid Atherosclerosis Study (ACAS)* e o *Asymptomatic Carotid Surgery Trial (ACST)*.

No estudo *ACAS*, 1662 pacientes com estenose de no mínimo 60%, demonstrada por ultrassonografia ou arteriografia (com critério de medição do grau de estenose semelhante ao estudo *NASCET*), foram randomizados a receberem terapia antitrombótica com ou sem EC, e acompanhados por 5 anos. No grupo clínico, a taxa de AVE ipsilateral foi de 11%, pouco mais do que o dobro da observada nos pacientes operados (5%), o que aponta uma incidência anual de 2,2% de AVE com a abordagem conservadora. A redução de risco absoluto foi de 5,9%, e de risco relativo de 55% ($p < 0,004$), sendo este benefício mais significativo nos homens, pela elevada taxa de complicações observadas no sexo feminino (3,6% vs 1,2%)⁸. Possivelmente, a magnitude da diferença nos resultados entre os grupos do estudo *ACAS*, tenha sido prejudicada em função da alta taxa de complicações maiores (2,3%), a maior parte das quais relativas à arteriografia (1,2%), e mais incidentes nas mulheres³⁸. Atualmente, o estudo *ACAS* sustenta a recomendação da *American Heart Association* em indicar EC para pacientes com estenose

superior a 60%, desde que a morbidade e a mortalidade não ultrapassem a 3%⁵.

Recentemente concluído, o ensaio europeu *ACST* arrolou mais de 3000 casos assintomáticos, com estenose carotídea \geq do que 70%, determinada por US ou angiografia por ressonância nuclear magnética. Com critérios de elegibilidade mais liberais do que os utilizados no *ACAS*, de forma a aumentar a aplicação clínica de suas conclusões, 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, já incorporada a morbimortalidade hospitalar ($p < 0,001$)³⁹.

Preliminarmente aos estudos *ACAS* e *ACST*, outros ensaios haviam demonstrado resultados conflitantes. O *Mayo Asymptomatic Carotid Endarterectomy Study*, que randomizou 158 pacientes para terapia com AAS ou para EC, teve de ser interrompido pela elevada ocorrência de infarto agudo do miocárdio no grupo cirúrgico⁴⁰. O *Veterans Affairs Cooperative Study* incluiu 444 pacientes com estenose \geq do que 50%, e não demonstrou diferenças nos desfechos AVE maior e óbito em 30 dias, entre os grupos clínico e cirúrgico⁴¹. No ensaio *CASANOVA*, em 410 casos analisados, a EC também não se mostrou benéfica em comparação ao tratamento antitrombótico, embora a exclusão de pacientes com lesões \geq do que 90% tenha limitado sobremaneira a validade do estudo⁴².

Recentemente, o estudo *Asymptomatic Carotid Stenosis and Risk of Ipsilateral Hemispheric Ischaemic Events (ACSRS)*, acompanhou por 5 anos a evolução de 1115 pacientes assintomáticos, com estenose \geq do que 50% pelos critérios do *ECST*, quanto a ocorrência de fenômenos isquêmicos. Elevação da

creatinina sérica, história de AITs em hemisfério contralateral, e maior percentual de estenose (acima de 70%), foram fatores independentes de risco, e triplicaram a taxa de eventos (7.3% vs 2.3%), achados que sugerem o possível envolvimento de outras variáveis, além do percentual da estenose, na gênese dos eventos isquêmicos, em placas já existentes⁴³.

A tabela 1 sumariza as indicações atualmente aceitas para EC, de acordo com o percentual de estenose, e o ensaio clínico correspondente.

Tabela 1. Indicações atuais de endarterectomia carotídea

CLASSE CLÍNICA	INDICAÇÃO (*)	ENSAIOS
SINTOMÁTICOS	Lesão \geq 70%	NASCET ⁷ , ECST ³⁴
	Lesão \geq 50 e $<$ 70%	NASCET ³³ , ECST ³⁶ , VACS ³⁷
ASSINTOMÁTICOS	Lesão \geq 60%	ACAS ⁸
	Lesão \geq 70%	ACST ³⁹

(*) Considerando-se risco de óbito e/ou AVE perioperatório \leq 3%.

NASCET: North American Symptomatic Carotid Trial; ECST: European Carotid Surgery Trial; VACS: Veterans Affairs Cooperative Study; ACAS: Asymptomatic Carotid Atherosclerosis Study; ACST: Asymptomatic Carotid Surgery Trial.

Aterosclerose e Inflamação

Frente ao alarmante número de mais de 19 milhões de mortes por eventos cardiovasculares a cada ano, a detecção precoce das placas ditas vulneráveis ou de alto risco, a partir de marcadores de ação local ou sistêmica, têm sido uma prioridade mundial da investigação científica^{44,10}.

Historicamente concebida como uma condição decorrente do acúmulo progressivo de lipoproteínas do colesterol, atualmente sabe-se que a aterosclerose é uma doença inflamatória crônica do sistema arterial.

A demonstração de que apenas 50% dos pacientes ateroscleróticos apresentam dislipidemia⁴⁵, e de que a prevalência de fatores de risco tradicionais, como tabagismo, hipertensão arterial e diabetes, após os 65 anos, não diferem substancialmente da encontrada em indivíduos normais⁴⁶, apontam para o envolvimento de outros mecanismos.

Rothwell e cols, estudando 3007 casos sintomáticos de doença carotídea, observaram que pacientes com irregularidade angiográfica, também na carótida contralateral à lesão culpada, apresentavam maior taxa de infarto agudo do miocárdio e morte súbita, possivelmente por um comportamento sistêmico na gênese de fenômenos aterotrombóticos mais agressivos⁴⁷. Recentemente, Rossi e cols estudaram a correlação entre dados de ultrassonografia carotídea em 164 pacientes, com ou sem infarto agudo do miocárdio. Nos 69 casos com infarto, as placas apresentavam conteúdo mais amolecido e menos fibrocálcico, quando comparados aos 95 pacientes sem eventos cardíacos, sugerindo que a instabilidade seja desencadeada ou agravada por uma resposta à injúria vascular⁴⁸, hipótese compartilhada por outros autores^{49,50,51,52,53,54}.

No modelo atual de aterogênese, a alteração da homeostase do endotélio, a partir de agressores de ação local ou sistêmica, como acúmulo de lipoproteínas, estresse mecânico (hipertensão arterial, intervenções percutâneas), toxinas do fumo ou substâncias oxidantes, agentes infecciosos, doenças auto-imunes, homocisteinemia, entre outros, constitui o evento inicial de formação e progressão da placa⁵⁵. Primeiramente ocorre perda do caráter antiagregante às células circulantes, a partir da produção de moléculas de adesão, integrinas e selectinas, pelas células endoteliais. Estas substâncias

modulam o recrutamento e a agregação de monócitos, macrófagos, linfócitos e plaquetas, alterando a permeabilidade do endotélio. A migração das células brancas para dentro da parede arterial se acompanha da liberação de agentes pró-inflamatórios, sobretudo de interleucinas, fator de necrose tumoral, CD40 ligante, cicloxigenase-2 e metaloproteinases. O estado de inflamação se retroalimenta positivamente, adquirindo alcance sistêmico, com liberação adicional de citocinas pelos leucócitos, maior agregação de partículas de LDL oxidado na superfície endotelial, produção e liberação hepática de substâncias inflamatórias, como a proteína C reativa (PCR), ativação da cascata inflamatória sistêmica e do sistema do complemento⁵⁶. A presença de macrófagos modificados pela fagocitose de partículas lipídicas antigênicas, denominados células espumosas (*foam cells*), no espaço subendoletial, e sua coalescência na matriz intersticial, tipificam histologicamente a placa nesta fase⁵⁷, possivelmente guardando relação direta com o grau de desestabilização da doença⁵⁸.

Com a manutenção do estímulo pró-inflamatório, dá-se início à fase proliferativa, em um primeiro momento com marcada síntese de colágeno, a partir da ativação de fibroblastos, de modo a formar a capa fibrosa⁵⁹. Esta fase é marcada pela produção intensa de interleucinas, fator de necrose tumoral alfa e beta, fator de crescimento plaquetário, fator de crescimento fibroblástico, e pela formação da placa madura, a qual geralmente tem crescimento excêntrico e sofre um processo dinâmico de remodelamento positivo^{10,60}. Alterações da composição da matriz extracelular, principalmente pela ação das enzimas proteolíticas (metaloproteinases), determinam degradação do colágeno, aumento da síntese de elastina, e menores níveis de hidroxapatita, e têm sido

relacionadas a lesões vulneráveis⁶¹. Podem ocorrer graus variáveis de calcificação, a qual sugere-se conceder estabilidade à placa^{62,63}, formação de lagos lipídicos ou necróticos pouco celularizados, que, ao contrário, parecem predispor a eventos⁶⁴, principalmente quando associados ao adelgaçamento da capa fibrosa⁶⁵. Por outro lado, pesquisadores como Trostorf e cols têm demonstrado que o afinamento da capa fibrosa, embora não seja um pré-requisito essencial para a ruptura da placa, está relacionado ao grau de apoptose das células musculares lisas, e associado à presença de sintomas (Figura 1)⁶⁶.

O desenvolvimento da placa de ateroma também compromete progressivamente a propriedade anticoagulante da superfície endotelial. Atividade inflamatória local estimulando agregação plaquetária, aumento da fosfolipase A2, vasoconstrição mediada por angiotensina II, endotelinas, e serotonina, ação trombogênica de tromboxane e leucotrienos, além de toxinas do tabaco, e a ação das metaloproteinases de matriz extracelular, são os principais fatores promotores de um estado pró-trombótico, que, nas lesões avançadas e/ou vulneráveis, está associado à hemorragia intraplaca, ruptura da capa fibrosa, trombose e embolização⁵⁷.

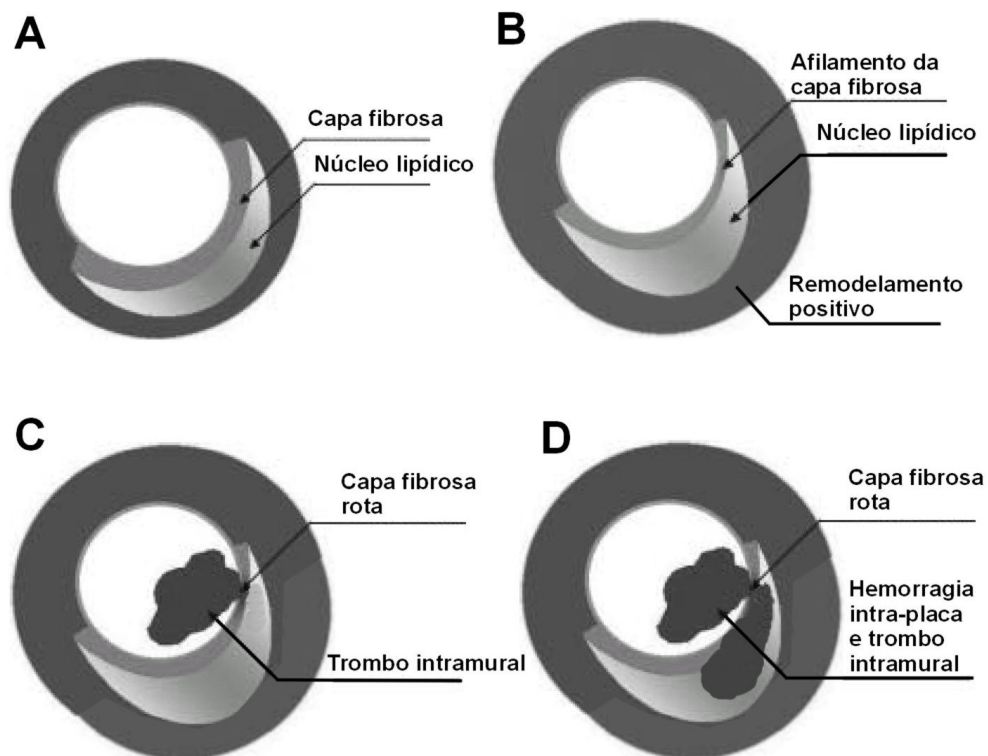


Figura 1. Patogênese da placa aterosclerótica: A) lesão inicial; B) remodelamento positivo e afinamento da capa fibrosa; C) Ruptura da capa fibrosa sem hemorragia intraplaca; D) Hemorragia intraplaca determinando ruptura da capa fibrosa. *Adaptado de Rohde LE e Lee RT⁶⁰.*

A tabela 2 apresenta sucintamente os processos inflamatórios envolvidos na disfunção endotelial, e seus efeitos biológicos.

Tabela 2. Processos inflamatórios da disfunção endotelial, formação da placa aterosclerótica e principais efeitos biológicos

ALTERAÇÃO DA FUNÇÃO	PRINCIPAIS MEDIADORES DIRETOS	ELEMENTOS CELULARES	RESPOSTA INFLAMATÓRIA	EFEITO BIOLÓGICO
ADESIVIDADE PERMEABILIDADE	Moléculas adesão Integrinas Selectinas LDL-OX MCP-1	Células endoteliais Monócitos Macrófagos Linfócitos T Plaquetas	↑ Citoquinas ↑ IL 1,2,6,7,8,18 ↑ Interferon ↑ CD40L ↑ MMP ↑ COX2	- Recrutamento adicional de elementos celulares - Agregação LDL-OX - Ativação da cascata inflamatória - Ativação complemento - Seqüestro macrófagos (células espumosas) - Proliferação de CML
PROLIFERAÇÃO CELULAR	TNF-alfa IL-1 PDGF FGF MMP	Células musculares lisas	- Proliferação CML - Síntese colágeno (capa fibrosa) - Degradação matriz extracelular	- Formação placa madura - Remodelamento positivo
TROMBOGÊNESE	Fosfolipase A2 Angiotensina II Endotelinas Serotonina Tromboxane Leucotrienos Toxinas do cigarro Oxidantes	Plaquetas Células endoteliais	-Perda das propriedades anticoagulantes - Estado trombogênico	- Hemorragia intraplaca - Ruptura da capa fibrosa - Trombose - Embolização

LDL-ox: LDL oxidado; MCP-1: fator quimiotático de monócitos; IL: interleucina; CD40L: CD40 ligante; MMP: metaloproteinases; COX: cicloxigenase; TNF: fator de necrose tumoral; PDGF: fator de crescimento plaquetário; FGF: fator de crescimento fibroblástico; CML: células musculares lisas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Wolf PA. Fifty years at Framingham: contributions to stroke epidemiology. *Adv Neurol* 2003;92:165-72.
- 2 Hankey GJ. Stroke: how large a public health problem, and how can the neurologist help? *Arch Neurol* 1999;56:748-54.
- 3 Chaturvedi S. Public health impact of carotid endarterectomy. *Neuroepidemiology* 1999;18:15-21.
- 4 Goldstein LB, Adams R, Becker K, Furberg CD, Gorelick PB, Hademenos G, et al. Primary prevention of ischemic stroke: a statement for healthcare professionals from the Stroke Council of the American Heart Association. *Stroke* 2001;32:280-99.
- 5 Guidelines for carotid endarterectomy. A multidisciplinary consensus statement from the Ad Hoc Committee of the American Heart Association. *Circulation* 1995;91:566-79.
- 6 Coward LJ, Featherstone RL, Brown MM. Safety and efficacy of endovascular treatment of carotid artery stenosis compared with carotid endarterectomy. A cochrane systematic review of the randomized evidence. *Stroke* 2005;36:905-11.
- 7 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;325:445-53.

-
- 8 Executive Committee for the Asymptomatic Carotid Atherosclerosis Study. Endarterectomy for asymptomatic carotid artery stenosis. *JAMA* 1995;273:1421-8.
 - 9 Glagov S, Weisenberg E, Zarins DK, Stankunavicius R, Kolettis GJ. Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med* 1987;316:1371-5.
 - 10 Fuster V, Moreno PM, Fayad ZA, Corti R, Badimon JJ. Atherothrombosis and high-risk plaque. *J Am Coll Cardiol* 2005;46:937-54.
 - 11 Falk E. Coronary plaque disruption. *Circulation* 1995;92:657-71.
 - 12 Mann JM, Davies MJ. Vulnerable plaque: relation of characteristics to degree of stenosis in human coronary arteries. *Circulation* 1996;94:928-31.
 - 13 Schwamm LH, Pancioli A, Acker JE, Goldstein LB, Zorowitz RD, Shephard TJ et al. Recommendations for the establishment of stroke systems care. Recommendations from the American Heart Association's Task Force on the development of Stroke Systems. *Stroke* 2005;36:690-703.
 - 14 Gorelick PB, Sacco RL, Smith DB, Alberts M, Mustone-Alexander L, Rader D et al. Prevention of a first stroke. A review of guidelines and a multidisciplinary Consensus Statement from the National Stroke Association. *JAMA* 1999;281:1112-20.
 - 15 Silver FL, Norris JW, Lewis AJ, Hachinski VC. Early mortality following stroke: a prospective review. *Stroke* 1984;15:492-6.

-
- 16 Petty GW, Brown RD, Sicks JR, O'Fallon WM, Whisnant JP. Survival and recurrence after first cerebral infarction in Rochester, Minnesota, 1975-1989. *Cerebrovasc Dis* 1996; 6 suppl: 6-7.
- 17 Wolf PA, D'Agostino RB, O'Neal MA, Sytkowski P, Kase CS, Belanger AJ et al. Secular trends in stroke incidence and mortality. The Framingham Study. *Stroke* 1992;23:1551-5.
- 18 Consensus group. Consensus statement on the management of patients with asymptomatic atherosclerotic carotid bifurcation lesions. *Int Angiol* 1995; 14:5-17.
- 19 Fine-Edelstein JS, Wolf PA, O'Leary DH, Poehlman H, Belanger AJ, Kase CS, D'Agostino RB. Precursors of extracranial carotid atherosclerosis in the Framingham Study. *Neurology* 1994;44:1046-50.
- 20 O'Leary DH, Polak JF, Kronmal RA, Kittner SJ, Bond MG, Wolfson SK et al. Distribution and correlates of sonographically detected carotid artery disease in the cardiovascular health study. The CHS Collaborative Research Group. *Stroke* 1992; 23:1752-60.
- 21 Rubio F, Martinez-Yelamos S, Cardona P, Krupinski J. Carotid endarterectomy: is it still a gold standard? *Cerebrovasc Dis* 2005;20:suppl2:119-22.
- 22 Gillum RF. Epidemiology of carotid endarterectomy and cerebral arteriography in the United States. *Stroke* 1995;26:1724-28.

-
- 23 Bravata DM, Ho S, Brass LM, Concato J, Scinto J, Meehan TP. Long-term mortality in cerebrovascular disease. *Stroke* 2003;34:699-704.
- 24 Taylor TN, Davis PH, Torner JC, Holmes J, Meyer JW, Jacobson MF. Lifetime cost of stroke in the United States. *Stroke* 1996;27:1459-66.
- 25 Fries FJ, Koop CE, Beadle CE, Cooper PP, England MJ, Greaves RT et al. Reducing health care cost by reducing the need and demand for medical services. *N Engl J Med* 1993;329:321-5.
- 26 Isard PA, Forbes JF. The cost of stroke to the National Health service in Scotland. *Cerebrovasc Dis* 1992;2:47-50.
- 27 Evers SM, Engel GL, Ament AJ. Cost of stroke in the Netherlands from a societal perspective. *Stroke* 1997;28:1375-81.
- 28 Smurawska LT, Alexandrov AV, Bladin CF, Norris JW. Cost of acute stroke in Toronto, Canada. *Stroke* 1994;25:1628-31.
- 29 Reed SD, Blough DK, Meyer K, Jarvik JG. Inpatients costs length of stay, and mortality for cerebrovascular events in community hospitals. *Neurology* 2001;57:305-14.
- 30 Imparato AM. Carotid endarterectomy: indications and techniques for carotid surgery. In: Ascher E, editor. *Haimovici's vascular surgery*. 5th edition. Oxford: Blackwell Publishing;2004.pp.787-809.
- 31 Ovbiagele B, Kidwell CS, Saver JL. Epidemiological impact in the United States of a tissue-based definition of transient ischemic attack. *Stroke* 2003;34:919-24.

-
- 32 Moore WS, Quinones-Baldrich W, Krupski WC. Indications, surgical technique and results for repair of extracranial occlusive lesions. In: Rutherford RB editor. *Vascular Surgery*. 5th edition. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 2000. pp. 1789-1822.
- 33 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;339:1415-25.
- 34 European Carotid Surgery Trialist's 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;337:1235-43.
- 35 European Carotid Surgery Trialist's Collaborative Group: Endarterectomy for moderate symptomatic stenosis: Interim results from the MRC European Carotid Surgery Trial. *Lancet* 1996; 347:1591-3.
- 36 Rotwell PM, Gutnikov AS, Warlow CP, European Carotid Surgery Trialist's Collaboration. Reanalysis of the final results of the European Carotid Surgery Trial. *Stroke* 2003;34:514-23.
- 37 Mayberg MR, Wilson SE, Yatsu F, Weiss DG, Messina L, Hershey LA et al, for the Veterans Affairs Cooperative Studies program 309 Trialist Group. Carotid endarterectomy and prevention of cerebral ischemia in symptomatic carotid stenosis. *JAMA* 1991;266:3289-94.

-
- 38 Howard G, Baker WH, Chambless LE, Howard VJ, Jones AM, Toole JF. For the Asymptomatic Carotid Atherosclerosis Study investigators. An approach for the use of Doppler ultrasound as a screening tool for hemodynamically significant stenosis (despite heterogeneity of Doppler performance): a multicenter experience. *Asymptomatic Carotid Atherosclerosis Study Investigators. Stroke* 1996; 27:1951-7.
- 39 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.
- 40 Mayo Asymptomatic Carotid Endarterectomy Study Group. Results of a randomized controlled trial of carotid endarterectomy for asymptomatic carotid stenosis. *Mayo Clin Proc* 1992;67:513-8.
- 41 Hobson RW, Weiss DG, Fields WS, Goldstone J, Moore Ws, Towne JB et al, for the Veterans Affairs Cooperative Study Group. Efficacy of carotid endarterectomy for asymptomatic carotid stenosis. *N Engl J Med* 1993; 328:221-7.
- 42 The CASANOVA Study Group. Carotid surgery versus medical therapy in asymptomatic carotid stenosis. *Stroke* 1991;22:229-35.
- 43 Nicolaidis AN, Kakkos SK, Griffin M, Sabetai M, Dhanjil S, Tegos T et al, for the Asymptomatic Carotid Stenosis and Risk of stroke (ACSRS) Study Group. Severity of asymptomatic carotid stenosis and risk of ipsilateral

-
- hemispheric ischemic events: results from the ACSRS Study. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2005;30:275-84.
- 44 Naghavi M, Libby P, Falk E, Casscells W, Litovsky S, Rumberger J et al. From vulnerable plaque to vulnerable patients. A call for new definitions and risks assessment strategies: part I. *Circulation* 2003;108:1664-72.
- 45 EUROASPIRE: a European Society of Cardiology survey of secondary prevention of coronary heart disease: principal results. *Eur Heart J* 1997;18:1556-82.
- 46 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;290:891-7.
- 47 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.
- 48 Rossi A, Franceschini L, Fusaro M, Cicoira M, Eleas AA, Golia G et al. Carotid atherosclerotic plaque instability in patients with acute myocardial infarction. *Int J Cardiol* 2005;nov 30. Article in press.
- 49 Hansson, GK. Mechanisms of disease: inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005;352:1685-95.
- 50 Buffon A, Biasucci LM, Liuzzo G, D'Onofrio G, Maseri A. Widespread coronary inflammation in unstable angina. *N Engl J Med* 2002;347:5-12.

-
- 51 Modifi R, Crotty TB, McCarthy P, Sheehan SJ, Mehigan D, Keaveny TV. Association between plaque instability, angiogenesis and symptomatic carotid occlusive disease. *Br J Surg* 2001;88:945-50.
- 52 Alexander RW. Inflammation and coronary artery disease. *N Engl J Med* 1994;331:468-9.
- 53 Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W Jr, Rosenfeld ME et al. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the committee on vascular lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 1994;89:2462-78.
- 54 Lombardo A, Biasucci LM, Lanza GA, Coli S, Silvestri P, Cianflone D et al. Inflammation as a possible link between coronary and carotid plaque instability. *Circulation* 2004;109:3158-63.
- 55 Landmesser U, Horning B, Drexler H. Endothelial function: a critical determinant in atherosclerosis? *Circulation* 2004;109:II27-31.
- 56 Bhakdi S, Torzewski M, Klouche M, Hemmes M. Complement and atherogenesis: binding of CRP to degraded, nonoxidized LDL enhances complement activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:2348-54.
- 57 Mullenix OS, Andersen CA, Starnes BW. Atherosclerosis as inflammation. *Ann Vasc Surg* 2005;19:130-8.

-
- 58 Jander S, Sitzer M, Schumann R, Schroeter M, Siebler M, Steinmetz H et al. Inflammation in high-grade carotid stenosis. A possible role for macrophages and T cells in plaque destabilization. *Stroke* 1998;29:1625-30.
- 59 Jonasson L, Holm J, Skalli O, Bondjers G, Hansson GK. Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arteriosclerosis* 1986;6:131-8.
- 60 Rohde LE, Lee RT. Pathophysiology of atherosclerotic plaque development and rupture: an overview. *Semin Vasc Med* 2003;3:347-54.
- 61 Gonçalves I, Moses J, Dias N, Pedro LM, Fernandes JF, Nilsson J et al. Changes related to age and cerebrovascular symptoms in the extracellular matrix of human carotid plaques. *Stroke* 2003;34:616-22.
- 62 Shaalan WE, Cheng H, Gewertz B, McKinsey JF, Schwartz LB, Kartz D et al. Degree of carotid plaque calcification in relation to symptomatic outcome and plaque inflammation. *J Vasc Surg* 2004;40:262-9.
- 63 Nandalur KR, Baskurt E, Hagspiel KD, Philips CD, Kramer CM. Calcified carotid atherosclerotic plaque is associated less with ischemic symptoms than noncalcified plaque on MDCT. *Am J Roentgenol* 2005;184:295-8.
- 64 Ouhlous M, Flach HZ, de Weert TT, Hendriks JM, van Sambeek MR, Dippel DW et al. Carotid plaque composition and cerebral infarction: MR imaging study. *Am J Neuroradiol* 2005;25:1044-9.

-
- 65 Adami IM, van der Geest RJ, Wasserman BA, Mohamed MA, Reiber JHC, Lelieveldt BPF. Automatic segmentation and plaque characterization in atherosclerotic carotid artery MR images. *MAGMA* 2004;16:227-34.
- 66 Trostorf F, Buchkremer M, Harmjanz A, Kablau M, Jander S, Geiger K et al. Fibrous cap thickness and smooth muscle cells apoptosis in high-grade carotid artery stenosis. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2005;29:528-35.

ARTIGO DE REVISÃO II

**Vulnerabilidade da Doença Aterosclerótica de Carótidas:
do Laboratório à Sala de Cirurgia - Parte II (*)**

**Vulnerability of Atherosclerotic Carotid Disease: from Laboratory to
Operating Room – Part II**

Dr. Luciano Cabral Albuquerque¹

Dra. Luciane Barreneche Narvaes¹

Dr. Aluísio Antunes Maciel²

Dr. Henrique Staub³

Dr. Maurício Friedrich⁴

Dr. João Rubião Hoefel Filho⁵

Dr. Maurício Anes⁵

Dr. Luis Eduardo Rohde⁶

- ✓ Serviços de Cirurgia Cardiovascular¹, Patologia², Reumatologia³, Neurologia⁴ e Centro de Diagnóstico por Imagem⁵ do Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.
- ✓ Serviço de Cardiologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre⁶.
- ✓ Programa de Pós-Graduação em Cardiologia e Ciências Cardiovasculares da Universidade Federal do Rio Grande do Sul^{1,6}

(*) Aceito para publicação na Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular 2006; 21(3).

INTRODUÇÃO

A aterosclerose é um processo crônico predominantemente silencioso em sua evolução, no qual fatores locais e sistêmicos interagem de forma a abreviar ou retardar eventos clínicos. Na doença obstrutiva de carótidas, o caráter catastrófico do acidente vascular encefálico (AVE), atualmente uma prioridade em saúde pública no mundo desenvolvido, justifica a emergente preocupação com características morfológicas, inflamatórias e bioquímicas da placa ateromatosa, que eventualmente possam conferir vulnerabilidade às lesões.

Atualmente, sabe-se que uma agressão sistemática promove respostas compensatórias que alteram a homeostase do endotélio, sobretudo através da ativação de leucócitos e plaquetas, e da alteração de permeabilidade. As células endoteliais secretam moléculas vasoativas de adesão, citocinas e fatores de crescimento, entre outras substâncias, as quais, se o processo de agressão não é bloqueado, continuam a ser produzidas indefinidamente. Igualmente, a resposta inflamatória induz à migração e à proliferação de células musculares lisas na porção subendotelial, através de mediadores químicos liberados por macrófagos modificados pela captação de lipídeos (células espumosas), e por subtipos específicos de linfócitos T. Nesta fase, o crescimento intraparietal da área de inflamação ocorre no sentido oposto à luz da artéria, em direção à adventícia, sempre estimulando a liberação de enzimas proteolíticas da matriz intersticial, de citocinas, e de fator de crescimento tumoral, o que eventualmente pode induzir necrose focal^{1,2}. Além disso, o processo de acúmulo dos macrófagos está relacionado ao aumento da

concentração plasmática de interleucinas, proteína C reativa, e de outros marcadores inflamatórios, propostos atualmente como sinalizadores da presença ou da instabilidade clínica na aterosclerose, tanto em nível local quanto sistêmico³.

Também o possível papel de agentes infecciosos, como a clamídia, tem sido investigado na gênese das placas de ateroma, ou no desencadeamento de eventos, com dados ainda inconclusivos^{4,5,6}.

Outra manifestação da atividade imunoinflamatória na doença aterosclerótica, diz respeito à produção de auto-anticorpos que agridem células endoteliais e/ou células musculares lisas da parede arterial. Estudos experimentais e clínicos têm proposto que o aumento dos níveis séricos de anticorpos contra fosfolipídeos da membrana celular, ou contra proteínas de choque térmico (Hsp), esteja associado a eventos agudos na aterosclerose, embora a relação causal ainda não esteja bem elucidada^{7,8,9,10}.

Além disso, o aprimoramento dos métodos de imagem não invasivos, como ultrassonografia e angiografia por ressonância nuclear magnética, tem proporcionado maior conhecimento da estrutura morfológica da placa de carótida, e sua possível associação com desfechos clínicos. A capacidade destes métodos em identificar sinais de instabilidade, a partir da análise do conteúdo e da superfície da placa, tem sido recentemente testada em diversos estudos de correspondência histológica¹¹.

A parte I desta revisão analisou estudos recentes, relacionados à vulnerabilidade na doença aterosclerótica de artérias carótidas, expressa em seus aspectos epidemiológicos, clínicos, e inflamatórios. Nesta parte, serão abordados os marcadores séricos de uso corrente, bem como aspectos

histológicos, e de diagnóstico por imagem, relativos à instabilidade da doença carotídea, discutindo possíveis implicações terapêuticas, ou eventuais modificações de paradigmas relacionados às indicações atuais de intervenção.

Marcadores Sorológicos

Nos últimos anos, particular interesse tem ocorrido na identificação de mediadores inflamatórios circulantes, associados aos processos ateroscleróticos e à predição de eventos. Possíveis implicações terapêuticas, como o papel das estatinas, do ácido acetilsalicílico, e dos inibidores da cicloxigenase, têm sido igualmente estudadas^{12,13}.

Na doença obstrutiva de carótida, trabalhos recentes têm procurado esclarecer o papel das várias substâncias envolvidas na formação, no crescimento e possivelmente na instabilização da placa. Embora Waddington e cols, estudando a oxidação de ácidos graxos na doença carotídea, não tenham conseguido demonstrar sua correlação direta com a instabilidade clínica¹⁴, Nishi e cols observaram que níveis elevados de anticorpos anti-LDL oxidado tiveram correspondência com maior infiltração de macrófagos na análise histológica de 44 espécimes de EC, sugerindo que este marcador possa associar-se à vulnerabilidade da placa¹⁵. Incontroverso, entretanto, parece ser o papel protetor do HDL-colesterol na progressão da doença carotídea. Johnsen e cols, acompanhando por até 7 anos, 1952 pacientes com doença carotídea diagnosticada por ultrasonografia, evidenciaram taxa menor de crescimento das lesões no grupo com quartil superior dos níveis de HDL¹⁶. Este achado vem ao encontro do observado tanto em relação à recorrência de desfechos coronários¹⁷, como cerebrais¹⁸.

Outro sinalizador de interesse na resposta imunológica que acompanha o processo aterosclerótico é o complexo CD40 e CD40 ligante. Inicialmente relacionados à atividade exclusivamente linfocitária, estes marcadores já têm sua expressão documentada em outras células presentes na formação da placa de ateroma. Há evidências de que a interação CD40 e CD40L contribui para instabilização da placa, através da interação com células endoteliais, células musculares lisas, macrófagos e plaquetas, promovendo a liberação de citocinas, fator de necrose tumoral alfa, metaloproteinases da matriz extracelular e substâncias pró-coagulantes¹⁹. Uma subanálise do *Women's Health Study* demonstrou níveis significativamente elevados de CD40L em 130 mulheres que desenvolveram infarto agudo do miocárdio ou AVE no período de 4 anos, em comparação a participantes pareadas para a idade, mas com níveis de CD40L normais ($p = 0,02$)²⁰. Em outro estudo, a análise de 2908 casos de síndromes coronarianas agudas demonstrou maior risco de recorrência de eventos, no período de 16 semanas, quando os níveis de CD40L encontravam-se acima do percentil 90²¹. A hipótese de que níveis plasmáticos de CD40L relacionam-se com características morfológicas de vulnerabilidade, foi testada por Blake e cols, em 49 pacientes com estenose de carótida. Embora os níveis de CD40L não tenham se correlacionado ao percentual de estenose, CD40L acima da média se associou com a presença de lagos lipídicos acelulares na placa²².

Estudos de correspondência histológica também têm se proposto ao estudo da eventual ação das metaloproteinases na ateromatose de carótida. Sapienza e cols, analisando 53 casos consecutivos de EC, demonstraram que nos pacientes com lesões classificadas microscopicamente como instáveis, os

níveis séricos de diversas metaloproteinases foram significativamente maiores do que nas lesões estáveis²³. Entretanto, através do doppler transcraniano, Loftus e cols observaram que níveis elevados da metaloproteinase tipo 9, relacionaram-se à maior ocorrência de microembolismo intraoperatório, durante EC²⁴, enquanto Molloy e cols conseguiram demonstrar a correlação entre elevação metaloproteinase tipo 8, sintomas recentes, embolização silenciosa e evidência histológica de ruptura da placa²⁵. Recentemente, Sluijter e cols propuseram que a atividade das diferentes MMPs pode variar de acordo com o predomínio celular da placa de ateroma. A análise de 150 espécimes de EC revelou atividade significativamente maior das metaloproteinases de matriz tipo 8 e 9 em lesões ricas em macrófagos, e da metaloproteinase tipo 2 em placas com predomínio de células musculares lisas²⁶. A correlação entre os elementos celulares, sintomas e níveis de metaloproteinases de matriz tipo 8 e 9, também foi testada por Verhoeven e cols, em 404 pacientes submetidos à cirurgia de carótida. Nos casos com AIT ou AVE recentes, os níveis de metaloproteinases foram significativamente maiores do que os observados nos pacientes assintomáticos ($p < 0,001$)²⁷. No entanto, embora pareça haver relação direta entre a elevação das MMPs e vulnerabilidade da placa, não há ainda evidências para seu emprego como marcador de risco na prática clínica.

Outro grupo de substâncias com atividade comprovada na doença ateromatosa, tanto em nível tecidual quanto plasmático, são as interleucinas²⁸. Embora a maioria das interleucinas tenha papel pró-inflamatório, sendo as mais estudadas as interleucinas-1,-2,-6,-7,-8 e -18, alguns subgrupos parecem ter qualidades antiinflamatórias, o que determina uma modulação de efeito resultante, e produz oscilações durante o curso da doença. Atividade

marcadamente mais elevada de interleucina-18 foi observada por Mallat e cols em placas de carótida sintomáticas ou ulceradas, em comparação a casos considerados estáveis²⁹. Também foi demonstrado efeito estimulante na produção de fator de necrose tumoral alfa, interferon e moléculas de adesão, ou indutor da apoptose celular, a partir da interação com a interleucina-12³⁰. Recentemente, a relação entre elevados níveis de interleucina-18 circulante e adelgaçamento da capa fibrosa em placas de carótida, foi demonstrada por Yamagami e cols, em 366 pacientes sem eventos cerebrovasculares prévios³¹, achados comparáveis aos descritos por Elkind e cols, em relação à interleucina-2³². Embora com menor consistência, o possível efeito antiinflamatório de alguns tipos de interleucinas, também tem sido investigado. Em análise histoquímica preliminar de 21 espécimes de EC, demonstrou-se relação inversa entre a expressão da interleucina-10 com a produção de óxido nítrico sintetase e a taxa de apoptose celular, sugerindo um efeito protetor contra a excessiva necrose intraplaca, e supostamente conferindo estabilidade às lesões³³.

Dentre todas as substâncias inflamatórias associadas à aterogênese, a proteína C reativa (PCR) tem se afirmado como o mais importante biomarcador de eventos cardiovasculares, principalmente após a descoberta da forma de aferição ultrasensível (PCR-us)^{34,35}. A PCR é um polipeptídeo secretado pelo fígado, principalmente em resposta à elevação dos níveis plasmáticos de interleucina-6, que apresenta ação comprovada na transformação dos macrófagos em células espumosas³⁶, na produção de moléculas de adesão e selectinas³⁷, no recrutamento local de monócitos³⁸, na ativação do complemento³⁹, na destruição celular mediada por linfócitos T⁴⁰, na

potencialização dos efeitos da angiotensina II⁴¹ e na atenuação da produção e da ação do óxido nítrico⁴².

A associação entre níveis elevados de PCR-us e prognóstico cardiovascular foi primeiramente demonstrada nas síndromes coronarianas agudas (SCA), a partir da evidência de que níveis de PCR-us \geq do que 0,3 mg/dl relacionaram-se a mais episódios isquêmicos, e pior evolução, tanto precoce quanto tardiamente^{43,44}. Em pacientes após infarto agudo do miocárdio, o estudo CARE⁴⁵ revelou risco aumentado de eventos recorrentes ou morte, na presença de níveis elevados de PCR-us, resultado consonante com o descrito por outros autores^{46,47}.

Quando associado ao escore de Framingham e aos níveis de LDL colesterol, a PCR-us pode adquirir valor preditivo adicional, na evolução da doença coronariana^{48,49}. Além disso, a PCR-us tem sido apontada em vários estudos como fator de predição de morte súbita, infarto cerebral ou desenvolvimento de doença arterial obstrutiva de membros inferiores, ainda que com efeito menos robusto^{50,51,52}.

O papel da PCR-us na predição de eventos cerebrovasculares foi estudada, em uma coorte do estudo de *Framingham*, que correlacionou a incidência do primeiro episódio de AIT ou AVE, com quartis séricos de PCR-us, ao longo de 14 anos. Nos 1462 casos avaliados, o quartil superior duplicou o risco relativo dos desfechos nos homens, e triplicou nas mulheres, independente da idade, embora na amostra predominassem indivíduos idosos (média 70 anos)⁵¹. Também tem sido sugerido que a PCR-us elevada pode ser fator preditivo independente de morte e eventos recorrentes, após o primeiro episódio de AVE^{53, 54}.

Sem analisar desfechos clínicos, Wang e cols demonstraram que o desenvolvimento de espessamento médio-intimal da carótida interna, foi mais freqüente no quartil superior de PCR-us, em 3173 pacientes com placas assintomáticas, ainda que este resultado tenha se mantido significativo somente nas mulheres, após ajuste para outros fatores de risco⁵⁵. No estudo de *Rotterdam*, os níveis de PCR-us, interleucina-6 e de moléculas de adesão foram comparados à gravidade da aterosclerose, em sítios arteriais distintos. Na bifurcação carotídea, somente níveis do tercil superior da PCR-us (\geq do que 0,28 mg/dl) tiveram associação com espessamento médio-intimal, e duplicaram o risco de desenvolver-se estenose moderada ou grave (acima de 50%)⁵⁶. A associação entre PCR-us, espessamento médio-intimal da carótida e risco de AVE, foi prospectivamente avaliada em 5417 pacientes, no *Cardiovascular Health Study*⁵⁷. Observou-se correlação fortemente positiva entre os níveis de PCR-us e AVE, nos casos com espessamento presente ($p < 0,02$).

A associação entre concentração plasmática de PCR-us, estrutura histológica e imunocitológica da placa de carótida, e presença de sintomas neurológicos, foi criteriosamente investigada por Garcia e cols, em 62 pacientes submetidos a EC⁵⁸. A média de PCR-us foi significativamente superior nos casos sintomáticos e nos classificados como instáveis à histologia ($p < 0,001$), demonstrando-se também significante correlação positiva com a presença de magrófagos e linfócitos T na placa. Estes autores propõem o emprego da PCR-us como marcador de vulnerabilidade da doença carotídea, embora o fato de o grupo classificado como clinicamente instável incluir também pacientes com quadros isquêmicos antigos, sem sintomas recentes,

possa ter representado um viés de confusão relevante, dificultando a validação dos resultados.

Por outro lado, a associação de PCR-us, interleucina-6 e infarto cerebral silencioso foi prospectivamente avaliada em 194 pacientes sem evidências de doença carotídea, coronariana ou arteriopatia periférica, no período de 10 anos. Nos 40 casos de infarto cerebral silencioso de pequena extensão, documentados por ressonância encefálica, os níveis de PCR-us e IL-6 mostraram-se significativamente superiores, o que sugere uma ação pró-inflamatória destes mediadores também nas artérias intracranianas⁵⁹.

Entretanto, o comportamento da PCR-us em pacientes com doença coronariana e estenose carotídea, tem sido inferido como não linear e controverso por alguns autores. Choi e cols avaliaram prospectivamente o desenvolvimento de eventos coronarianos e espessamento médio-intimal da carótida interna, em uma coorte de 122 pacientes hipertensos, e compararam com os níveis de interleucina-6 e PCR-us. Além de a PCR-us apresentar-se significativamente elevada somente nos casos de doença coronariana, este marcador não obteve correlação com doença de carótidas, nem mesmo quando comparado a controles normotensos⁶⁰.

Recentemente, a *American Heart Association* publicou revisão sistemática com as recomendações para uso clínico de vários marcadores inflamatórios na aterosclerose. Em relação à PCR-us, concluiu-se que não encontrava-se justificado ainda seu emprego como marcador isolado de eventos na população geral, e sim como adjuvante em pessoas com risco estimado de doença coronária entre 10 a 20%, em 10 anos⁶¹. Entretanto, a extensão deste *Guidelines* correspondente às doenças cerebrovasculares,

demonstrou haver evidências insuficientes para o uso sistemático da PCR-us na prevenção primária do AVE. Na prevenção secundária, há reconhecido valor prognóstico quando associada a outros fatores, e seu papel como determinante de decisões terapêuticas ainda não está estabelecido⁶².

A influência da dosagem de PCR-us associada aos níveis séricos do complexo fosfolipase A₂-lipoproteína, na incidência de AVE, foi recentemente investigada no estudo *ARIC*, em 12819 pacientes. Após ajuste para outros fatores de risco, quando PCR-us e complexo fosfolipase A₂-lipoproteína encontravam-se nos tercis superiores, o risco de AVE elevou-se 8 vezes ($p < 0,001$)⁶³. Resultados similares foram relatados no *Rotterdam study*, que analisou a relação entre complexo fosfolipase A₂-lipoproteína e desenvolvimento de doença coronária e/ou AVE⁶⁴.

O fator quimiotático de monócitos 1 têm sido referido como relacionado à dislipidemia e à instabilização da doença coronária, por alguns autores^{65,66}. No *Dallas Heart Study*⁶⁷, a proporção de pacientes com coronariopatia detectável aumentou linearmente conforme a elevação dos quartis de fator quimiotático de monócitos 1 (de 17% no quartil inferior para 32% no quartil maior - $p < 0,0001$). Expressão aumentada de fator quimiotático de monócitos 1 foi descrita em carótidas ateromatosas de humanos, em comparação às sadias, porém sua relação com desfechos agudos ainda não é clara⁶⁸.

Agentes Infecciosos

A possível contribuição de alguns processos infecciosos, acelerando o crescimento das placas de ateroma, ou facilitando a ruptura e/ou instabilização, vem sendo estudada, em especial a infecção por *Chlamydia pneumoniae*

(clamídia). Anticorpos contra clamídia têm sido detectados em espécimes de placas coronarianas e de carótida, o que sustenta a hipótese de causalidade^{69,70}. Fagerberg e cols estudaram prospectivamente a associação entre anticorpos contra clamídia e citomegalovírus, com a incidência de eventos cerebrovasculares⁷¹. Analisando 152 homens durante 6,5 anos, os autores demonstraram um risco 8 vezes maior de AVE, nos pacientes com altos títulos contra clamídia, mas não contra citomegalovírus ($p=0,043$). Posteriormente, os mesmos pesquisadores observaram que a seropositividade para clamídia associava-se ao espessamento médio-intimal da carótida, em 113 homens com hipertensão arterial⁷².

A correlação entre infecção recente por clamídia e instabilidade clínica da doença carotídea, foi investigada por Katsenis e cols, em 35 pacientes submetidos à EC¹⁹. A positividade dos anticorpos se relacionou com presença de sintomas, mas não com características ultrassonográficas de vulnerabilidade. Gibbs e cols, em estudo mais criterioso, comparam a presença de clamídia na placa, o grau de embolização perioperatória (por doppler transcraniano) e a ocorrência de infarto cerebral, em 98 pacientes sintomáticos⁷³. A constatação de que somente 25% dos casos tinham evidências de clamídia na placa, e a ausência de correlação deste achado com taxa de embolização ou AVE ipsilateral, sugerem que outros mecanismos estejam envolvidos no processo de instabilização. Controvérsia semelhante há em relação ao uso de antibióticos contra clamídia, como estratégia de prevenção secundária e terciária da doença cerebrovascular. Ensaio clínico conduzido por Sander e cols comparou o efeito da roxitromicina no desenvolvimento de placas de carótida em 272 pacientes acima de 55 anos,

com infarto cerebral prévio. Após seguimento de 3 anos, no grupo intervindo, houve diminuição significativa do espessamento médio-intimal, em casos com titulação positiva, porém nenhuma alteração nos pacientes não reagentes⁷⁴. No entanto, Leven e cols não observaram diferença na titulação de anticorpos IgG contra clamídia, aferidos também por imunofluorescência, entre 106 pacientes com doença coronária, e 112 controles sadios, provavelmente por reação cruzada com outras bactérias⁷⁵. Por outro lado, Vainas e cols descreveram associação entre seropositividade IgA, e tromboembolismo intra-operatório, em placas consideradas histologicamente estáveis, sugerindo que a infecção por clamídia possa exercer também um efeito trombogênico na aterosclerose⁷⁶.

Estudo prospectivo recente, analisando o comportamento dos anticorpos contra clamídia, herpes vírus e citomegalovírus, em 109 pacientes com estenose carotídea acima de 50%, não apontou diferenças na titulação entre os grupos, nem na comparação entre pacientes assintomáticos e sintomáticos, ou mesmo na comparação com os níveis de PCR-us, enfraquecendo a hipótese de que processos infecciosos determinem diretamente a instabilização de lesões existentes⁷⁷.

Papel dos Auto-anticorpos

O papel da ativação do sistema imune, a partir de anticorpos anticélulas endoteliais, vem sendo recentemente pesquisado, na doença aterosclerótica. Farsi e cols, procedendo a dosagem de anticorpos anti- β 2 glicoproteína (IgG e IgM – ELISA) em 93 pacientes submetidos à angioplastia coronária percutânea, e comparando a 105 controles, observaram que a prevalência dos anticorpos foi de 13% no grupo com doença coronária e de apenas 1% no grupo controle

($p < 0,001$). Além disso, dentro do grupo com doença coronária, os títulos foram significativamente maiores nos pacientes com angina instável do que os com angina estável ($p < 0,01$), e a taxa de reestenose angiograficamente documentada foi de 66% nos casos com anticorpos positivos, e de somente 14% nos pacientes negativos ($p < 0,0004$)⁷. Estes achados em conjunto sugerem a presença de um estado inflamatório imunoativado na doença instável, ou submetida à injúria endotelial por cateter.

A correlação dos níveis de anticorpos anticardiolipina com o risco de infarto agudo do miocárdio, foi estudada em uma coorte do *Helsinki Heart Study*, que, entre 19.000 pacientes, acompanhou 133 homens portadores de dislipidemia, por 5 anos. A dosagem de anticorpos da classe IgG foi significativamente maior nos casos que desenvolveram infarto subsequente ou morte súbita, do que nos controles (0,417 vs 0,361; $p < 0,005$)⁷⁸. Sherer e cols também evidenciaram elevação de anticorpos anticardiolipina e anti- $\beta 2$ glicoproteína em pacientes com doença coronária, com e sem hipertensão arterial⁷⁹. Resultados semelhantes em relação à arteriopatia periférica foram descritos por de Godoy e cols, em 40 pacientes com idade entre 45 e 84 anos, nos quais o risco de desenvolver claudicação quadruplicou quando níveis elevados de anticorpos anticardiolipina foram observados ($p < 0,0001$)⁸⁰. Estudando a relação entre anticorpos anti- $\beta 2$ glicoproteína e infarto cerebral, Staub e cols compararam 92 casos de AVE com 93 controles, demonstrando que níveis elevados de anticorpos da classe IgA conferiram risco significativamente aumentado para a ocorrência do desfecho ($p = 0,025$)⁸¹. Entretanto, análise recente de uma coorte de 4974 pacientes do estudo de *Framingham* demonstrou que a elevação dos títulos de anticorpos

anticardiolipina associou-se a risco significativo de desenvolver AVE e/ou de AIT apenas nas mulheres⁸².

Na doença obstrutiva de carótidas, já foi demonstrada por George e cols expressão aumentada de anticorpos anti- β 2 glicoproteína nas regiões subendoteliais da placa, possivelmente indicando interação com células endoteliais, macrófagos e linfócitos⁸³. Entretanto, somente estudos futuros poderão confirmar se os anticorpos anticardiolipina constituem fator de risco independente, ou meramente um fenômeno incidental, nos processos ateroscleróticos¹⁰.

Também o papel citoprotetor das proteínas de choque térmico (*heat shock protein* - Hsp) tem sido investigado no curso das doenças cardiovasculares. As Hsp constituem uma família de proteínas com peso molecular entre 20 e 150 daltons, que demonstram seqüências de aminoácidos altamente homogêneas entre espécies diferentes, como bactérias e o homem. Elas têm sua expressão aumentada nas situações de estresse, como infecções, alta temperatura, exposição a radicais livres e injúria endotelial. Várias evidências experimentais e clínicas têm relacionado a expressão das Hsp, ou mesmo os títulos de anticorpos, à severidade e à instabilidade da doença aterosclerótica. Estas análises utilizam proteínas de choque térmico recombinantes de agentes infecciosos, como micobactérias, *Helicobacter pylori* e *Chlamydia pneumoniae*, atribuindo uma possível relação de eventos cardiovasculares agudos a uma resposta auto-imune desencadeada ou não pela exposição a bactérias^{9,84,85,86,87}.

Birnie e cols pesquisaram a possível associação de anticorpos anti-Hsp 65 com aterosclerose coronária, em 136 pacientes submetidos a

coronariografia. Estes autores constataram que as titulações do anticorpo se relacionaram com extensão e severidade da doença, e que pacientes com infecção por *Helicobacter pylori* tratados de forma efetiva exibiram queda nas titulações⁸⁸.

Zhu e cols, por sua vez, avaliaram a possibilidade de que anticorpos anti-Hsp 60 humana conferirem risco para aterosclerose. Dos 391 pacientes submetidos a coronariografia, 75% apresentaram fração IgG positiva. A presença do anticorpo esteve também associada à severidade da doença, pois títulos altos se relacionaram à doença em maior número de vasos, mesmo após o ajuste para outros fatores de risco⁸⁹.

Prohaszka e cols avaliaram níveis de anticorpos anti-Hsp 60 e 65 em uma coorte envolvendo 3 grupos de pacientes: 1) coronariopatas graves submetidos à cirurgia de revascularização; 2) pacientes com fatores de risco para cardiopatia isquêmica e coronariografia normal; 3) controles saudáveis. Na análise multivariada, apenas os níveis de anticorpos anti-Hsp 60 foram consideravelmente mais altos no grupo I do que nos outros grupos⁹⁰.

Mukherjee e cols investigaram o papel dos anticorpos anti-Hsp em pacientes que evoluíram com reestenose de artérias coronárias, após angioplastia percutânea. O grupo de pacientes com reestenose cursou com níveis sustentados do anticorpo, enquanto aqueles com evolução favorável apresentaram queda nos seus títulos, sugerindo que um declínio nos níveis pode indicar um prognóstico melhor após revascularização⁹¹.

Na doença obstrutiva de carótidas, a correlação com títulos elevados de anticorpos anti-Hsp 65 foi primeiramente demonstrada por Xu e cols⁹². Em estudo transversal populacional, os autores dosaram os títulos séricos de

anticorpos IgG contra proteína de choque térmico 65 recombinante de micobacteria em 867 indivíduos com idade entre 40 e 79 anos e compararam os resultados com a avaliação da bifurcação carotídea por ultrassonografia. Houve uma correlação significativa entre títulos elevados de anticorpos e presença de placas nos pacientes acima de 60 anos, mesmo após controle de fatores como sexo, tabagismo, diabetes e dislipidemia ($p < 0,003$).

O significado clínico desta associação foi investigado subsequenteemente pelos mesmos autores, através do seguimento de 750 pacientes arrolados para o estudo anterior, constatando-se que a elevação dos referidos anticorpos não somente apresentou forte correlação com lesões evolutivas de carótida ($r = 0,78$), como também foi um fator preditivo independente de mortalidade em 5 anos ($p < 0,001$)⁹³.

No entanto, somente através de estudos futuros, a relevância dos anticorpos antiproteína de choque térmico na aterogênese, e suas possíveis implicações diagnósticas e terapêuticas, poderão estar melhor compreendidas⁹⁴.

Aspectos Morfológicos do Ateroma na Doença Carotídea

Embora o percentual de estenose carotídea defina as decisões terapêuticas na atualidade, os eventos cerebrovasculares são determinados por placas vulneráveis, que em parte dependem de características morfológicas distintas. Nesse contexto, vários estudos têm proposto aprimoramentos nas técnicas de imagem, no sentido de identificar as placas de alto risco, a maioria dos quais utilizando a composição histológica como padrão ouro^{11,95}. Entretanto, a correlação direta entre histologia e instabilidade da

placa ainda não se encontra consistentemente estabelecida. Estudo clássico de Hatsukami e cols analisaram constituintes histológicos de 43 espécimes de EC, quanto à quantidade de fibrose intimal, lagos lipídicos ou necróticos, hemorragia intraplaca e calcificação, e comparou com a presença de sintomas pré-operatórios, não tendo encontrado diferenças significativas entre as classes clínicas⁹⁶. Recentemente, revisão sistemática de Lovett e cols avaliou a qualidade e a comparabilidade de 73 estudos correlacionando exames de imagem e histologia da placa de carótida. Somente em 23% deles houve avaliação da reprodutibilidade na metodologia das diferentes técnicas de aquisição de imagem, e em apenas 12% os dados histológicos foram comparáveis, não havendo em nenhum dos estudos referência à possível limitação de resultados. Além de recomendarem importantes cuidados no acesso e leitura dos dados histológicos, como utilização de amostras representativas com número semelhante de casos com e sem sintomas, registro do tempo em relação aos sintomas, e do tempo entre a obtenção da imagem e da peça, cuidados de orientação espacial no corte e inclusão das peças, obtenção de cortes de no máximo 3 mm, e leitura cega, os autores reforçaram a necessidade de critérios mais homogêneos para estudos que visem avaliar a associação imagem-histologia⁹⁷.

Além de possuir papel definido na determinação do grau de estenose, e de ser considerada suficiente para a decisão de intervenção, a ultrassonografia tem contribuído substancialmente para a caracterização do conteúdo e da superfície da placa de carótida^{98,99,100,101,102}. Estágios iniciais da aterosclerose podem ser monitorados pela espessura ultrassonográfica da parede arterial, chamada espessamento médio-intimal, que, embora não defina se a infiltração

é atribuída à íntima, ou por hipertrofia da média, é reconhecido como marcador de evolução em lesões precoces¹⁰³. Por outro lado, várias evidências indicam que o afinamento da capa fibrosa, a presença de conteúdo “mole”, ou de ulceração, conferem instabilidade à placa^{104,105}, e que a proximidade dos “lagos” de necrose do lúmen, principalmente se associado à infiltração de macrófagos, predispõe a eventos clínicos¹⁰⁶. Além disso, tanto em modelos utilizando a ultrassonografia de superfície, quanto em estudos mais recentes com reconstrução computadorizada ou com ultrassonografia intravascular, as imagens de baixa ecogenicidade têm sido relacionadas ao conteúdo necrótico ou hemorrágico da placa^{107,108,109}, e o grau de calcificação considerado inversamente proporcional à estabilidade das lesões. É bem conhecido que, para estenoses de qualquer significado hemodinâmico, pacientes com placas menos ecogênicas apresentam maior incidência de infarto cerebral. Entretanto, a alta variabilidade intra e interobservador, na aquisição convencional de imagens e nos critérios de caracterização morfológica da placa, impôs aperfeiçoamentos técnicos¹¹⁰. Utilizando a reconstrução computadorizada da imagem, com estratificação em “escala de cinza”, Gronholdt e cols analisaram prospectivamente 146 pacientes com doença de carótida, durante 4 anos, e observaram que a baixa ecogenicidade associou-se a valores mais baixos na escala, e foi fator de risco independente para AVE, embora apenas no grupo de pacientes sintomáticos (n=135)¹¹¹. Recentemente, Sztajzel e cols acrescentaram o mapeamento de fluxo colorido, à escala de cinza estratificada, em 28 pacientes submetidos à EC, e encontraram forte correspondência histológica quanto à determinação de áreas hemorrágicas, lagos de necrose e irregularidade da superfície¹¹². Também a codificação da imagem do modo B,

por um modelo computadorizado tridimensional, em tempo real, tem sido proposta na identificação das placas de risco, diminuindo artefatos ultrassonográficos¹¹³.

A ressonância nuclear magnética (RNM) de alta resolução representa outro expressivo avanço na análise morfológica das placas de ateroma, através da evolução de modelos inicialmente *ex vivo*, que se mostraram inefetivos, para estudos de correspondência histológica e clínica *in vivo*. Von Ingersleben e cols compararam a imagem da bifurcação carotídea, obtida com a seqüência ponderada em T1, a cortes histológicos correspondentes, em pacientes submetidos à EC. Mesmo analisando apenas 8 espécimes, já obtiveram significativa correlação positiva na identificação de áreas de hemorragia, depósitos de lipídios, fibrose e calcificação¹¹⁴. Posteriormente, o mesmo grupo testou a correspondência histológica das características da capa fibrosa – normal *versus* afilada *versus* rota – em 22 pacientes. Utilizando o mesmo protocolo de RNM, e considerando espessura \geq do que 0,25 mm da capa fibrosa como normal, o coeficiente de correlação observado foi de 0,88 ($p = 0,01$)¹¹⁵. Em outro estudo, a ruptura da capa fibrosa foi fortemente associada à história recente de AIT ou AVE ipsilateral, e ocorreu com maior freqüência em placas com capa fibrosa adelgada, ou com grande centro lipídico¹¹⁶.

A composição da placa pode ser determinada por RNM utilizando uma combinação de seqüências de pulsos, que variam conforme o tipo de estrutura que se pretende identificar, havendo por isto diferentes classificações propostas. Modelos baseados na quantificação de tecidos têm-se mostrado acurados e reprodutíveis¹¹. Saam e cols estudaram com RNM 31 candidatos à

EC, utilizando seqüências com ponderações em T1, T2, e *time-of-flight* (TOF). Na quantificação de centros lipídicos ou necróticos, perda de matriz extracelular, calcificação e fibrose, obtiveram correlação histológica entre 73% e 95% dos casos, propondo a inclusão da técnica em na avaliação prospectiva de placas ainda sem indicação de intervenção¹¹⁷.

De particular interesse tem sido a detecção pela RNM, de áreas de hemorragia ou de trombos murais, frequentemente associados a placas complexas e eventos clínicos. Moody e cols observaram que a presença de metahemoglobina produz uma amplificação do sinal na sequência ponderada em T1, o que confere à área na qual existe hemorragia subaguda ou trombo recente, um aspecto de sinal hiperintenso. Dentre 63 placas que apresentaram brilho intenso na RNM, 44 apresentaram pelo menos um dos 4 critérios histológicos de hemorragia, conferindo ao método uma especificidade de 84% e um valor preditivo positivo de 93%, com mínima variabilidade interobservador¹¹⁸. Em estudo seguinte, os mesmos autores correlacionaram esta hipersuscetibilidade magnética da placa, à presença de sintomas ipsilaterais recentes. Dados da RNM de 120 pacientes com AIT ou AVE foram comparados aos de 14 controles normais, e também à carótida contralateral (assintomática) do mesmo paciente. O sinal hiperintenso esteve presente em 60% das carótidas sintomáticas, em 36% das carótidas assintomáticas, e em nenhum dos controles ($p < 0,001$)¹¹⁹. A hipótese de que a hemorragia intraplaca estimula a progressão de placas existentes foi testada por Tanaya e cols, em 29 pacientes acompanhados por 18 meses. Neste período, a média de aumento do volume parietal, e do volume dos centros lipídicos, respectivamente, foi de 7% e 28% nos 14 casos com hemorragia intraplaca ao

início do estudo, e de 0.15% e 5% nos controles sem hemorragia prévia ($p < 0,01$). Além disso, novas áreas de hemorragia foram observadas em 43% dos casos e em nenhum dos controles ($p = 0,006$)¹²⁰. A Figura 1 demonstra exemplos de angiografias por RNM, com e sem sinal hiperintenso.

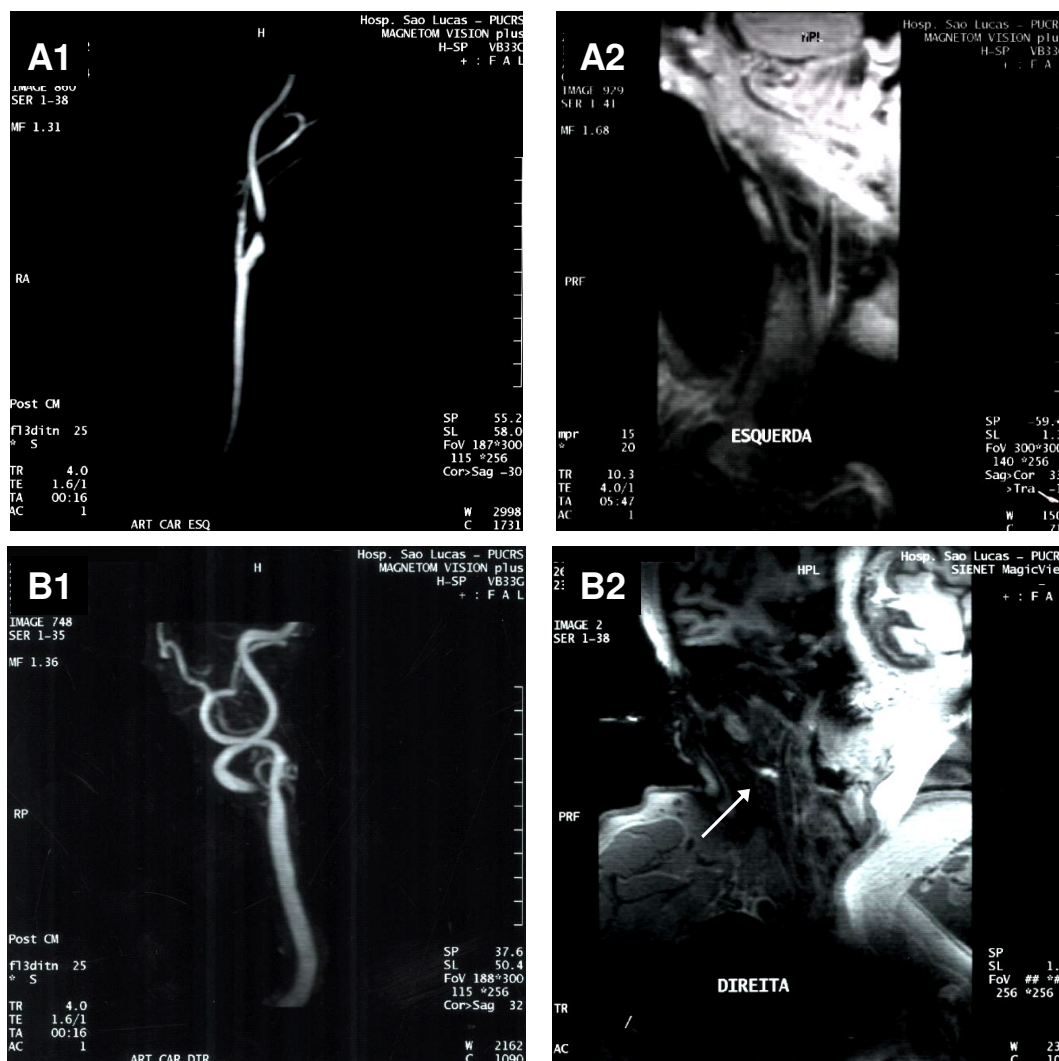


Figura 1. A1) Paciente assintomático com estenose de 90%; A2) ausência de sinal hiperintenso na seqüência ponderada em T1; B1) paciente com amaurose fugaz há 1 semana, e estenose de 90%; B2) sinal hiperintenso demonstrando hemorragia intraplaca na carótida interna (seta).

A determinação do tempo de evolução de hemorragias presentes na placa carotídea, pela RNM de alta resolução, foi recentemente proposta por Chu e cols¹²¹. Em 27 pacientes submetidos a RNM com seqüências ponderadas em T1, T2, e densidade de prótons (PDW), a qualificação da hemorragia em fresca, recente, ou antiga, demonstrou forte correlação histológica (coeficiente $kappa = 0,7$) e boa acurácia (especificidade de 90% e sensibilidade de 74%). Além disso, os autores sugerem que a utilização desta seqüência na RNM seja capaz de definir a precisa localização dos trombos em lesões avançadas, diferenciando hemorragia na placa de trombos justaluminais¹²². Uma vez que a hemorragia intraplaca, sem ruptura da capa fibrosa, não tem comprovada sua relação direta com sintomas, da mesma forma que trombos adjacentes à luz em geral indicam erosão, ulceração ou ruptura da placa, essa capacidade de diferenciação pela RNM, se comprovada em estudos subseqüentes, poderá ter importante implicação terapêutica no contexto da vulnerabilidade.

Ainda em avaliação preliminar, a RNM intravascular parece ser uma promissora técnica de caracterização da placa, principalmente da superfície intimal, com correspondência histológica já descrita em modelos *ex vivo*¹²³. Da mesma forma, um aprimoramento recentemente testado *in vitro* por Clarke e cols, diz respeito à validação de algoritmos automáticos de classificação da placa por RNM¹²⁴, utilizando como parâmetro a graduação histopatológica da *American Heart Association*¹²⁵.

Futuramente, técnicas como a imagem da atividade molecular dos macrófagos, a mensuração da angiogênese, da atividade enzimática intraplaca,

da apoptose celular, e de partículas-alvo da atividade inflamatória, deverão incorporar o cenário dos métodos de imagem na aterosclerose.

Na atualidade, os exames de uso corrente, na caracterização da placa de carótida, encontram-se descritos na tabela 1.

Tabela 1. Métodos de imagem e vulnerabilidade da doença carotídea

MÉTODO	CARACTERÍSTICA
RESSONÂNCIA MAGNÉTICA DE ALTA RESOLUÇÃO	<ul style="list-style-type: none"> - Afilamento/ ruptura da capa fibrosa - Centro lipídico/ necrótico - Hemorragia intraplaca - Trombos justaluminais - Neovascularização - Imageamento de macrófagos (?) - Atividade enzimática (?)
ULTRASSONOGRRAFIA	<ul style="list-style-type: none"> - Afilamento/ ruptura capa fibrosa - Ulceração/ erosão - Ecoluscência do conteúdo da placa (hemorragia ou centro lipídico)

CONCLUSÃO

A aterosclerose de artérias carótidas tem adquirido grande relevância epidemiológica, pela alta prevalência na população idosa, e por ser causa freqüente de AVE. A endarterectomia cirúrgica se constitui o tratamento de escolha nas lesões graves, tendo sua indicação referendada hoje apenas pelo percentual de estenose.

Entretanto, o emergente conceito de vulnerabilidade da placa, incorporado a partir do conhecimento de vários mecanismos bioquímicos, metabólicos, inflamatórios, e auto-imunes, presentes nas diferentes fases da aterogênese, tem estimulado o estudo de marcadores capazes de identificar as lesões de risco. Dentre os mediadores inflamatórios de expressão sistêmica, a PCR-us tem-se destacado como preditor da presença e da instabilidade de placas de carótida, embora interesse recente exista em relação ao comportamento do CD40, das metaloproteinases de matriz extracelular, do complexo fosfolipase A₂-lipoproteína. O papel dos anticorpos anticardiolipina e antiproteínas de choque térmico na doença de carótida, a despeito de vários estudos experimentais e clínicos, permanece incerto, assim como a suposta relação de causalidade entre infecção por clamídia e aterosclerose.

No âmbito dos métodos de imagem, a caracterização morfológica da placa tem sido prioritária no aprimoramento tanto da ultrassonografia quanto da RNM. A identificação da hemorragia intraplaca, de áreas hipocelularizadas de conteúdo rico em lipídios, de afilamento e/ou ruptura da capa fibrosa tem sido relacionada como marcador de risco iminente de eventos, principalmente através da RNM de alta resolução.

Por todos estes fatores, uma nova estratificação de risco aterotrombótico na doença carotídea, deverá envolver no futuro próximo, a combinação de marcadores inflamatórios sistêmicos, de imagem de alta resolução por RNM, de medidas da atividade molecular intraplaca, com o já consagrado percentual angiográfico de estenose, possivelmente redefinindo os critérios atuais de intervenção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Kullo IJ, Edwards WD, Schwartz RS. Vulnerable plaque: pathobiology and clinical implications. *Ann Intern Med* 1998;129:1050-60.
- 2 Ross, R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115-26.
- 3 Ballantyne CM, Nambi V. Markers of inflammation and their clinical significance. *Atheroscler Suppl* 2005;6:21-9.
- 4 Leinonen M. Pathogenic mechanisms and epidemiology of *Chlamydia pneumoniae*. *Eur Heart J* 1993;14 suppl:57-61.
- 5 Grayston JJ: *Chlamydia* in atherosclerosis. *Circulation* 1993;87:1408-9.
- 6 Katsenis C, Kouskouni E, Kolokotronis L, Rizos D, Dimakakos P. The significance of *Chlamydia pneumoniae* in symptomatic carotid stenosis. *Angiology* 2001;52:615-9.
- 7 Farsi A, Domeneghetti MP, Brunelli T, Gori AM, Fedi S, Gensini GF et al. Activation of the immune system and coronary artery disease: the role of anti-endothelial cell antibodies. *Atherosclerosis* 2001;154:429-36.
- 8 Wick G, Xu Q. Atherosclerosis: an autoimmune disease. *Exp Gerontol* 1999;34:559-66.
- 9 Mandal K, Jahangiri M, Xu Q. Autoimmunity to heat shock proteins in atherosclerosis. *Autoimmun Rev* 2004;3:31-7.

-
- 10 Sherer Y, Shoenfeld Y. Antiphospholipid antibodies: are they pro-atherogenic or an epiphenomenon of atherosclerosis? *Immunobiol* 2003;207:13-6.
 - 11 Nighoghossian N, Derex L, Douek P. The vulnerable carotid artery plaque. Current imaging methods and new perspectives. *Stroke* 2005;36:2764-72.
 - 12 Biasucci LM. CDC/AHA Workshop on markers of inflammation and cardiovascular disease. Application to clinical and public health practice. Clinical use of inflammatory markers in patients with cardiovascular diseases. A background paper. *Circulation* 2004;110:e560-67.
 - 13 Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH. Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N Engl J Med*. 1997;336:973-9.
 - 14 Waddington EI, Croft KD, Sienuarine K, Latham B, Puddey IB. Fatty acid oxidation products in human atherosclerotic plaque: na analysis of clinical and histopatological correlates. *Atherosclerosis* 2003;167:111-20.
 - 15 Nishi K, Itabe H, Uno M, Kitazato KT, Horigushi H, Shinno K et al. Oxided LDL in carotid plaques and plasma associates wtih plaque instability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:1649-54.
 - 16 Johnsen SH, Mathiesen EB, Fosse E, Joakimsen O, Bugge ES, Njøfstad I et al. Elevated high-density lipoprotein cholesterol levels are protective against plaque progression. *Circulation* 2005;112:498-504.

-
- 17 Olsson AG, Schwartz GG, Szarek M, Ezekowitz MD, Ganz P, Oliver MF et al. High-density lipoprotein, but not low-density protein cholesterol levels influence short-term prognosis after acute coronary syndrome: results from MIRACL trial. *Eur Heart J* 2005;26:853-5.
- 18 Tirschwell DL, Smith NL, Heckbert SR, Lemaitre RN, Longstreth Jr WT, Psaty BM. Association of cholesterol with stroke risk varies in subtypes and patients subgroups. *Neurology* 2004;63:1868-75.
- 19 Schönbeck U, Libby P. CD40 signaling and plaque instability. *Circ Res* 2001;89:1092-1103.
- 20 Schönbeck U, Varo N, Libby P, Buring J, Ridker PM. Soluble CD40L and cardiovascular risk in women. *Circulation* 2001;104:2266-8.
- 21 Kinlay S, Schwartz GG, Olsson AG, Rifai N, Sasiela WJ, Szarek M et al. Effect of atorvastatin on risk of recurrent cardiovascular events after an acute coronary syndrome associated with high soluble CD40 ligand in the MIRACL study. *Circulation* 2004;110:386-91.
- 22 Blake GJ, Ostfeld RJ, Yucel EK, Varo N, Schönbeck U, Blake MA et al. Soluble CD40 ligand levels indicate lipid accumulation in carotid atheroma. An in vivo study with high-resolution MRI. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:e11-4.
- 23 Sapienza P, di Marzo L, Borrelli V, Sterpetti A, Mingoli A, Cresti S et al. Metalloproteinases and their inhibitors are markers of plaque instability. *Surgery* 2005;137:355-63.

-
- 24 Loftus IM, Naylor AR, Bell PR, Thompson MM. Plasma MMP-9: a marker of carotid plaque instability. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2001;21:17-21.
- 25 Molloy KJ, Thompson MM, Jones JL, Schwalbe EC, Bell PRF, Naylor AR et al. Unstable carotid plaque exhibit raised matrix metalloproteinase-8 activity. *Circulation* 2004;110:337-43.
- 26 Sluijter JP, Pulskens WP, Schoneveld AH, Velema E, Stridjer CF, Moll F et al. Matrix metalloproteinases 2 is associated with stable and matrix metalloproteinases 8 and 9 with vulnerable carotid atherosclerotic lesions. *Stroke* 2006;37:235-9.
- 27 Verhoeven B, Hellings WE, Moll F, de Vries JP, de Kleijn D, de Bruin P et al. Carotid atherosclerotic plaque in patients with transient ischemic attacks and strokes have unstable characteristics compared with plaques in asymptomatic and amaurosis fugax patients. *J Vasc Surg* 2005;42:1077-81.
- 28 Von der Thüsen JH, Kuiper J, Van Berkel T, Biessen AL. Interleukins in atherosclerosis: molecular pathways and therapeutic potential. *Pharmacol Ther* 2003;55:133-66.
- 29 Mallat Z, Corbaz A, Scoazec A, Besnard S, Lesèche G, Chvatchko Y et al. Expression of Interleukin-18 in human atherosclerotic plaque and relation to plaque instability. *Circulation* 2001;104:1598-1603.
- 30 Fantuzzi G, Reed DA, Dinarello CA. IL-12 IFN-gamma is dependent on caspase-1 processing of the IL-18 precursor. *J Clin Invest* 1999;104:761-7.

-
- 31 Yamagami H, Kitagawa K, Hoshi T, Furukado S, Hougaku H, Nagai Y et al. Association of serum IL-18 levels with carotid intima-media thickness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:1458-62.
- 32 Elkind MS, Rundek T, Sciacca RR, Ramas R, Chen HJ, Boden-Abdala B et al. Interleukin-2 levels are associated with carotid artery intima-media thickness. *Atherosclerosis* 2005;180:181-7.
- 33 Mallat Z, Heymes C, Ohan J, Faggin E, Lesèche G, Tedgui A. Expression of interleukin-10 in advanced human atherosclerotic plaque. Relation to inducible nitric oxide synthetase expression and cell death. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:611-6.
- 34 Jialal I, Devaraj S, Vonugopal SK. C-reactive protein: risk marker or mediator in atherosclerosis? *Hypertension* 2004;4:6-11.
- 35 Koenig W. Predicting risk and treatment benefit in atherosclerosis: the role of C-reactive protein. *Int J Cardiol* 2005;98:199-206.
- 36 Fu T, Borensztajn J. Macrophage uptake of LDL bound to aggregate C-reactive protein: possible mechanism of foam-cell formation in atherosclerotic lesions. *Biochem J* 2002;266:195-201.
- 37 Pasceri V, Willerson JT, Yeh ET. Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. *Circulation* 2000;102:2165-8.
- 38 Nakagomi A, Freedman SB, Geczy CL. Interferon-gamma and lipopolisaccharide potentiate monocyte tissue factor induction by C-reactive

-
- protein: relationship with age, sex and hormone replacement treatment. *Circulation* 2000;101:1785-91.
- 39 Mold C, Gewurz H, Du Clos TW. Regulation of complement activation by C-reactive protein. *Immunopharmacology* 1999;42:23-30.
- 40 Nakajima T, Schulte S, Warrington KJ, Kopecky SL, Frye RL, Goronzy JJ et al. T-cell-mediated lysis of endothelial cells in acute coronary syndromes. *Circulation* 2002;105:570-5.
- 41 Nakajima T, Schulte S, Warrington KJ, Kopecky SL, Frye RL, Goronzy JJ et al. T-cell-mediated lysis of endothelial cells in acute coronary syndromes. *Circulation* 2002;105:570-5.
- 42 Venugopal SK, Devaraj S, Yuhanna I, Shaul P, Jialal I. Demonstration that C-reactive protein decrease eNOS expression and bioactivity in human aortic endothelial cells. *Circulation* 2002;106:1439-41.
- 43 Morrow DA, Rifai N, Antman EM, Weiner DL, McCabe CH, Cannon CP et al. C-reactive protein is a potent predictor of mortality independently of and in combination with troponin T in acute coronary syndromes: a TMI IIA substudy. *Thrombolysis in myocardial infarction. J Am Coll Cardiol* 1998;31:1460-5.
- 44 Heeschen C, Hamm CW, Bruemmer J, Simoons ML. Predictive value of C-reactive protein and troponin T in patients with unstable angina: a comparative analysis. CAPTURE investigators. *J Am Coll Cardiol* 2000;35:1535-42.

-
- 45 Ridker PM, Rifai N, Pfeffer MA, Sacks FM, Moyer LA, Goldman S et al. Inflammation, pravastatin, and the risk of coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. CARE investigators. *Circulation* 1998;98:839-44.
- 46 Retterstol L, Eikvar L, Bohn M, Erikssen J, Berg K. C-reactive protein predicts death in patients with previous premature myocardial infarction – a 10 year follow-up study. *Atherosclerosis* 2002;160:433-40.
- 47 Tomoda H, Aoki N. Prognostic value of C-reactive protein levels within six hour after onset of acute myocardial infarction. *Am Heart J* 2000;140:324-8.
- 48 Ridker PM, Rifai N, Rose L, Buring JE, Cook NR. Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *N Engl J Med* 2002;347:1557-65.
- 49 Albert MA, Glynn RJ, Ridker PM. Plasma concentration of C-reactive protein and calculated Framingham coronary heart disease score. *Circulation* 2003;108:161-5.
- 50 Albert CM, Ma J, Stampfer MJ, Ridker PM. Prospective study of C-reactive protein, homocysteine and plasma lipid levels as predictors of sudden cardiac death. *Circulation* 2002;105:2574-6.
- 51 Rost NS, Wolf PA, Kase CS, Kelly-Haes M, Silbershatz H, Massaro JM et al. Plasma concentration of C-reactive protein and risk of ischemic stroke and transient ischemic attack: the Framingham study. *Stroke* 2001;32:2575-9.

-
- 52 Ridker PM, Chusman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH. Plasma concentration of C-reactive protein and risk of developing peripheral vascular disease. *Circulation* 1998;97:425-8.
- 53 Kocer A, Canbulat C, Gozke E, Ilhan A. C-reactive protein is an indicator for fatal outcomes in first-time stroke patients. *Med Sci Monit* 2005;11:540-4.
- 54 Arenillas JF, Alvarez-Sabin J, Molina CA, Chacon P, Montaner J, Rovira A et al. C-reactive protein predicts further ischemic event in first-ever transient ischemic attack or stroke patients with intracranial large-artery occlusive disease. *Stroke* 2003;34:2463-8.
- 55 Wang TJ, Nam B, Wilson PWF, Wolf PA, Levy D, Polak JF et al. Association of C-reactive protein with carotid atherosclerosis in men and women: the Framingham heart study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:1662-7.
- 56 van der Meer IM, de Maat PM, Bots ML, Breteler MB, Meijer J, Kiliaan AJ et al. Inflammatory mediators and cell adhesion molecules as indicators of severity of atherosclerosis. The Rotterdam study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:838-42.
- 57 Cao JJ, Thach C, Manolio TA, Psaty BM, Kuller LH, Chaves PH et al. C-reactive protein, carotid intima-media thickness, and incidence of ischemic stroke in the elderly: the Cardiovascular Health Study. *Circulation* 2003;108:e9002-3.

-
- 58 Garcia BA, Ruiz C, Chacon P, Sabin JÁ, Matas M. High-sensitivity C-reactive protein in high-grade carotid stenosis: risk marker for unstable carotid plaque. *J Vasc Surg* 2003;38:1018-24.
- 59 Hoshi T, Kitagawa K, Yamagami H, Furukado S, Hougaku H, Hori M. Relations of serum high-sensitivity C-reactive protein and interleukin-6 levels with silent brain infarction. *Stroke* 2005;36:768-72.
- 60 Choi H, Cho DH, Shin HH, Park BP. Association of high-sensitivity C-reactive protein with coronary heart disease prediction, but not with carotid atherosclerosis, in patients with hypertension. *Circ J* 2004;68:297-303.
- 61 Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, Anderson, JL, Cannon RO, Criqui M et al. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice. A statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation* 2003;107:499-511.
- 62 Napoli MD, Schwaninger M, Cappelli R, Ceccarelli E, Gianfilippo G, Donati C et al. Evaluation of C-reactive protein measurement for assessing the risk and progress in ischemic stroke. A statement for health care professionals from the CRP Pooling Project Members. *Stroke* 2005;36:1316-29.
- 63 Ballantyne CM, Hoogeveen RC, Bang H, Coresh J, Folsom AR, Heiss G et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2, high-sensitivity C-reactive protein, and risk for incident stroke in middle-aged men and women in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study [abstract]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:E-127-8.

-
- 64 Oei HH, van der Meer IM, Hofman A, Koudstaal PJ, Stijnen T, Breteler MM et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2 activity is associated with risk of coronary heart disease and ischemic stroke. The Rotterdam study. *Circulation* 2005; 111:570-5.
- 65 Kowalski J, Okopien B, Madej A, Makowiecka K, Zielinski M, Kalina Z et al. Levels of sICAM-1, sVCAM-1 and MCP-1 in patients with hyperlipoproteinemia IIa and IIb. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2001;39:48-52.
- 66 Matsumori A, Furukawa Y, Hashimoto T, Yoshida A, Ono K, Shioi T et al. Plasma levels of the monocyte chemotactic and activating factor/monocyte chemoattractant protein-1 are elevated in patients with acute myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 1997;29:419-23.
- 67 Deo R, Khera A, McGuire DK, Murphy SA, Meo Neto JP, Morrow DA et al. Association among plasma levels of monocyte chemoattractant protein-1, traditional cardiovascular risk factors, and subclinical atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 2004;44:1812-8.
- 68 Nelken NA, Coughlin SR, Gordon D, Wilcox JN. Monocyte chemoattractant protein-1 in human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 1991;88:1121-7.
- 69 Linnanmäki E, Leinonen M, Mattila K, Neiminen MS, Valtonen V, Saikku P. Chlamydia pneumoniae-specific circulating immune complexes in patients with chronic coronary heart disease. *Circulation* 1993;87:1130-4.

-
- 70 Cochrane M, Walker P, Gibbs H, Timms P. Multiple genotypes of chlamydia pneumoniae identified in human carotid plaque. *Microbiology* 2005;151:2285-90.
- 71 Fagerberg B, Gnarpe J, Gnarpe H, Agewall S, Wikstrand J. Chlamydia pneumoniae but not cytomegalovirus antibodies are associated with future risk of stroke and cardiovascular disease: a prospective study in middle-aged to elderly patients with treated hypertension. *Stroke* 1999;29:299-305.
- 72 Schmidt C, Hulthe J, Wikstrand J, Gnarpe H, Gnarpe J, Agewall S et al. Chlamydia pneumoniae seropositivity is associated with carotid artery intima-media thickness. *Stroke* 2000;31:1526-31.
- 73 Gibbs RGJ, Sian M, Mitchell AWM, Greenhalgh RM, Davies AH, Carey N. Chlamydia pneumoniae does not influence atherosclerotic plaque behavior in patients with established carotid artery stenosis. *Stroke* 2000;31:2930-5.
- 74 Sander D, Winbeck K, Klingelhofer J, Etgen T, Conrad B. Reduced progression of early carotid atherosclerosis after antibiotic treatment and chlamydia pneumoniae seropositivity. *Circulation* 2002;106:2428-33.
- 75 Ieven MM, Hoymans VY. Early carotid atherosclerosis and chlamydia pneumoniae seropositivity: are there arguments to treat with antibiotics? *Circulation* 2004;110:e74-5.
- 76 Vainas T, Kurvers HA, Mess WH, de Graaf R, Ezzahiri R, Tordoir JH et al. Chlamydia pneumoniae serology is associated with thrombosis-related but

-
- not with plaque-related microembolization during carotid endarterectomy. *Stroke* 2002;35:1249-55.
- 77 Muller BT, Huber R, Henrich B, Adams O, Berns G, Siebler M et al. Chlamydia pneumoniae, herpes simplex virus and cytomegalovirus in symptomatic and asymptomatic high-grade internal carotid artery stenosis. Does infection influence plaque stability? *Vasa* 2005;34:163-9.
- 78 Vaarala O, Mänttari M, Manninen V, Tenkanen L, Puurunen M, Aho K et al. Anti-cardiolipin antibodies and risk of myocardial infarction in a prospective cohort of middle-aged men. *Circulation* 1995; 91:23-7.
- 79 Sherer Y, Tenenbaum A, Praprotnik S, Shemesh J, Blank M, Fisman EZ et al. Autoantibodies to cardiolipin and β 2-glycoprotein1 in coronary artery disease patients with and without hypertension. *Cardiology* 2002;97:2-5.
- 80 de Godoy JM, Batigália F, de Godoy MR, Brandão AC, Souza DR. Anticardiolipin antibodies as a risk factor of atherosclerosis in intermittent claudication. *Angiology* 2004;55:357-9.
- 81 Staub HL, Norman GL, Crowther T, da Cunha VR, Polanczyk A, Bohn JM et al. Antibodies to the atherosclerotic plaque components β 2-glycoprotein1 and heat-shock proteins as risk factors for acute cerebral ischemia. *Arq Neuropsiquiatr* 2003;61:757-63.
- 82 Janardhan V, Wolf PA, Kase CS, Massaro JM, D'Agostino RB, Franzblau C et al. Anticardiolipin antibodies and risk of ischemic stroke and transient ischemic attack: the Framingham cohort and offspring study. *Stroke* 2004;35:736-41.

-
- 83 George J, Harats D, Gilburd B, Afek A, Levy Y, Schneiderman J et al. Immunolocalization of β 2-glycoprotein1 to human atherosclerotic plaque: potential implications for lesions progression. *Circulation* 1999;99:2227-30.
- 84 Birnei DH, Holmet ER, McKay IC, Hood S, McColl KEL, Hillis WS. Association between antibodies to heat shock protein 65 and coronary atherosclerosis. *Eur Heart J* 1998; 19: 387-94.
- 85 Fong IW, Chiu B, Viira E, Tucker W, Wood H, Peeling RW. Chlamydial Heat shock protein-60 antibody and correlation with chlamydia pneumoniae in atherosclerotic plaques. *J Infect Dis* 2002;186:1469-73.
- 86 Xu Q. Role of heat shock proteins in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22:1547-59.
- 87 Benjamin IJ, McMillan R. Stress (heat shock) proteins – molecular chaperones in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 1998; 83:117-132.
- 88 Birnie DH, Holme ER, McKay IC, Hood S, McColl KE, Hillis WS. Association between antibodies to heat-shock protein 65 and coronary atherosclerosis. Possible mechanism of action of *Helicobacter pylori* and other bacterial infections in increasing cardiovascular risk. *Eur Heart J* 1998;19:366-7.
- 89 Zhu J, Quyyumi AA, Rott D, Csako G, Wu H, Halcox J et al. Antibodies to human heat-shock protein 60 are associated with the presence and severity of coronary artery disease. *Circulation* 2001;103:1071-5.
- 90 Prohaska Z, Buda J, Horvath L, Csaszar A, Karadi I, Skebeni A et al. Comparative study on antibodies to human and bacterial 60 kDa heat shock

-
- proteins in a large cohort of patients with coronary heart disease and healthy subjects. *Eur J Clin Invest* 2001;31:285-92.
- 91 Mukherjee M, De Benedictis C, Jewit D, Kakkar VV. Association of antibodies to heat-shock protein-65 with percutaneous transluminal coronary angioplasty and subsequent reestenosis. *Thromb Haemost* 1996;75:258-60.
- 92 Xu Q, Willeit J, Marosi M, Kleindienst R, Oberhollezner F, Kiechl S et al. Association of serum antibodies to heat-shock protein 65 with carotid atherosclerosis. *Lancet* 1993;341:255-9.
- 93 Xu Q, Kiechl S, Mayr M, Metzler B, Egger G, Oberhollezner F et al. Association of serum antibodies to heat-shock protein 65 with carotid atherosclerosis – clinical significance determined in a follow-up study. *Circulation* 1999;100:1169-74.
- 94 Mehta TA, Greenman J, Ettelaie C, Venkatasubramaniam A, Chetter IC, McCollum PT. Heat shock proteins in vascular disease – a review. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2005;29:395-402.
- 95 Yuan C, Mitsumori LM, Beach KW, Maravilla KR. Carotid atherosclerotic plaque: noninvasive MR characterization of vulnerable lesions. *Radiology* 2001;221:285-99.
- 96 Hatsukami TS, Ferguson MS, Beach KW, Gordon D, Detmer P, Burns D et al. Carotid plaque morphology and clinical events. *Circulation* 1997;28:95-100.

-
- 97 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;36:1091–7.
- 98 Reilly LM, Lusby RJ, Hughes L, Stoney RJ, Ehrenfeld WK. Carotid plaque histology using real-time ultrasonography: Clinical and therapeutic implications. *Am J Surg* 1983;146:188-93.
- 99 Langsfeld M, Gray-Weale AC, Lusby RJ. The role of plaque morphology and diameter reduction in the development of new symptoms in asymptomatic carotid arteries. *J Vasc Surg* 1989;9:548-57.
- 100 Goes E, Janssens W, Maillet B, Freson M, Steyaert L, Osteaux M. Tissue characterization of atheromatous plaques: correlation between ultrasound image and histological findings. *J Clin Ultrasound* 1990;18:611-7.
- 101 Droste DW, Karl M, Bohle RM, Kaps M. Comparison of ultrasonic and histopathological features of carotid artery stenosis. *Neurol Res* 1997;19:380-4.
- 102 Holdsworth RJ, McCollum PT, Bryce JS, Harrinson DK. Symptoms, stenosis and carotid plaque morphology: is plaque morphology relevant? *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1995;9:80-5.
- 103 Pignoli P, Tremoli E, Poli A, Oreste P, Pacletti R. Intimal plus medial thickness of the arterial wall: a direct measurement with ultrasound imaging. *Circulation* 1986;74:1399-1406.

-
- 104 Golledge J, Greenhalgh RM, Davies AH. The symptomatic carotid plaque. *Stroke* 2000;31:774-81.
- 105 Tegos TJ, Sohail M, Sabetai M, Robless P, Akbar N, Pare G, Stansby G, Nicolaidis AN. Echomorphologic and histopathologic characteristics of unstable carotid plaques. *Am J Neuroradiol* 2000;21:1937-44.
- 106 Bassiouny HS, Davis H, Massawa N, Gewertz BL, Glagov S, Zarins CK. Critical carotid stenoses: morphologic and chemical similarity between symptomatic and asymptomatic plaques. *J Vasc Surg* 1989;9:202-12.
- 107 Wolverson MK, Bashiti HM, Peterson GJ. Ultrasonic tissue characterization of atheromatous plaques using a high resolution real time scanner. *Ultrasound Med Biol* 1983;9:599-609.
- 108 Gronholdt LM. Ultrasound and lipoproteins as predictors of lipid-rich, rupture-prone plaques in the carotid artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:2-13.
- 109 Nissen SE, Yock P. Intravascular ultrasound: novel pathophysiological insights and current clinical applications. *Circulation* 2001;103:604-16.
- 110 Arnold JA, Modaresi KB, Thomas N, Taylor PR, Padayachee TS. Carotid plaque characterization by duplex scanning. Observer error undermine current clinical trials. *Stroke* 1999;30:61-5.
- 111 Gronholdt ML, Nordestgaard BG, Schroeder TV, Vorstrup S, Sillesen H. Ultrasonic echolucent carotid plaques predict future strokes. *Circulation* 2001;104:68-73.

-
- 112 Sztajzel R, Momjian S, Momjian-Mayor I, Murith N, Djebaili K, Boissard G et al. Stratified gray-scale median analysis and color mapping of the carotid plaque. Correlation with endarterectomy specimen histology of 28 patients. *Stroke* 2005;36:741-5.
- 113 Kern R, Szabo K, Hennerici M, Meairs S. Characterization of carotid artery plaques using real-time compound B-mode ultrasound. *Stroke* 2004;35:870-5.
- 114 von Ingersleben G, Schmiedl UP, Hatsukami TS, Nelson JA, Subramaniam DS, Ferguson MS et al. Characterization of atherosclerotic plaques at the bifurcation: correlation of high-resolution MR imaging with histologic analysis – preliminary study. *Radiographics* 1997;17:1417-23.
- 115 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;102:959-64.
- 116 Yuan C, Zhang SX, Polissar NL, Echelard D, Ortiz G, Davis JW et al. Identification of fibrous cap rupture with magnetic resonance imaging is highly associated with recent transient ischemic attack or stroke. *Circulation* 2002;105:181-5.
- 117 Saam T, Ferguson MS, V.L. Yarnykh, N. Takaya, D. Xu, N.L. Polissar NL et al. Quantitative evaluation of carotid plaque composition by in vivo MRI. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:234-9.

-
- 118 Moody AR, Murphy RE, Morgan PS, Martel AL, Delay GS, Allder S et al. Characterization of complicated carotid plaque with magnetic resonance direct thrombus imaging in patients with cerebral ischemia. *Circulation* 2003;107:3047-52.
- 119 Murphy RE, Moody AR, Morgan PS, Martel AL, Delay GS, Allder S et al. Prevalence of complicated carotid atheroma as detected by magnetic resonance direct thrombus imaging in patients with suspected carotid artery stenosis and previous acute cerebral ischemia. *Circulation* 2003;107:3053-8.
- 120 Takaya N, Yuan C, Chu B, Saam T, Polissar NL, Jarvik GP et al. Presence of intraplaque hemorrhage stimulates progression of carotid atherosclerotic plaques. A high-resolution magnetic resonance imaging study. *Circulation* 2005;111:2768-75.
- 121 Chu B, Kampschulte A, Ferguson M, Kerwin WS, Yarnykh VL, O'Brian KD et al. Hemorrhage in the atherosclerotic carotid plaque: a high-resolution MRI study. *Stroke* 2004;35:1079-84.
- 122 Kampschulte A, Ferguson MS, Kerwin WS, Nayak L, Polissar, Chu et al. Differentiation of intraplaque versus juxtaluminal hemorrhage/thrombus in advanced human carotid atherosclerotic lesions by in vivo magnetic resonance imaging. *Circulation* 2004;110:3239-44.
- 123 Larose E, Yeghiazarians Y, Libby P, Yucel K, Aikawa M, Kacher DF et al. Characterization of human atherosclerotic plaques by intravascular magnetic resonance imaging. *Circulation* 2005;112:2324-31.

-
- 124 Clarke SE, Beletsky V, Hammond RR, Hegele RA, Rutt BK. Validation of automatically classified magnetic resonance images for carotid plaque compositional analysis. *Stroke* 2006;37:93-7.
- 125 Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull Jr W et al. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Atherosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 1995;92:1355-74.

ARTIGO ORIGINAL EM PORTUGUÊS

Associação entre Hemorragia Intraplaca Avaliada por Ressonância Nuclear Magnética de Alta Resolução e Características Clínicas, Histopatológicas e Séricas de Pacientes Submetidos a Endarterectomia Carotídea

Dr. Luciano Cabral Albuquerque ¹

Dra. Luciane Barreneche Narvaes ¹

Dr. Aluísio Antunes Maciel ²

Dr. Henrique Staub ³

Dr. Maurício Friedrich ⁴

Dr. João Rubião Hoefel Filho ⁵

Dr. Maurício Barreira Marques⁵

Dr. Luis Eduardo Rohde ⁶

- ✓ Serviços de Cirurgia Cardiovascular¹, Patologia², Reumatologia³, Neurologia⁴ e Centro de Diagnóstico por Imagem⁵ do Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.
- ✓ Serviço de Cardiologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre⁶.
- ✓ Programa de Pós-Graduação em Cardiologia e Ciências Cardiovasculares da Universidade Federal do Rio Grande do Sul ^{1,6}

RESUMO

Introdução – A avaliação de sangramento em placas de ateroma no sistema arterial carotídeo pode ser realizada por ressonância nuclear magnética (RNM) de alta resolução. O significado clínico deste achado e sua associação com marcadores de atividade imunoinflamatória ainda não estão completamente elucidados.

Métodos – Estudamos pacientes consecutivos submetidos a endarterectomia carotídea, com avaliação simultânea da morfologia da placa por RNM de alta resolução e aferição de características clínicas, marcadores séricos imunoinflamatórios e estudo histopatológico. Hemorragia intraplaca foi identificada pela presença de sinal hiperintenso na RNM.

Resultados – Foram estudados 70 pacientes, com idade média de 66 ± 9 anos, sendo a maioria do sexo masculino (66%) e hipertensos (89%). A angiografia por RNM identificou 15 (21,5%) pacientes com estenose entre 50 e 69%, 15 (21,5%) com estenose entre 70 e 90%, e 40 (57%) com estenose acima de 90%. Sinal hiperintenso na RNM de alta resolução foi observado em 45 (64%) casos. Nenhuma característica clínica, laboratorial ou angiográfica identificou aqueles com sinais sugestivos de sangramento intraplaca na RNM, exceto pela história prévia de acidente isquêmico transitório. Os valores de proteína C reativa ultra-sensível foram semelhantes nos diferentes graus de estenose carotídea avaliada pela angiografia, porém foram significativamente maiores nos pacientes clinicamente instáveis ($p=0,006$) e naqueles que apresentaram sinal hiperintenso na RNM ($p=0,01$). Em análise agregada, considerando características clínicas e achados de RNM, indicativos de

instabilidade, observamos incremento progressivo dos níveis de proteína C reativa ultra-sensível ($p=0,02$).

Conclusões – Achados sugestivos de hemorragia intraplaca na RNM identificam pacientes instáveis do ponto de vista neurológico, com elevação de marcadores inflamatórios, independentemente do grau de estenose carotídea.

Palavras Chave – aterosclerose, hemorragia, carótidas, inflamação

INTRODUÇÃO

A doença obstrutiva cerebrovascular é uma das mais importantes causas de morbidade e mortalidade na população adulta, representando atualmente uma prioridade em saúde pública^{1,2}. A aterotrombose da bifurcação carotídea é responsável por cerca de 30% dos eventos isquêmicos cerebrais, sendo a endarterectomia de carótida o tratamento de escolha, em pacientes selecionados³. Embora as indicações atuais de endarterectomia carotídea estejam baseadas no percentual angiográfico de estenose, inúmeras evidências clínicas e histopatológicas indicam que eventos vasculares isquêmicos agudos ocorrem primordialmente por ruptura de placas vulneráveis^{4,5}. Neste contexto, a vulnerabilidade do ateroma, na maioria das vezes, independe do caráter obstrutivo das lesões, dependendo de fatores como a resposta imunoinflamatória sistêmica, o desequilíbrio estrutural da matriz extracelular, apoptose, hemorragia intraplaca, ruptura da capa fibrosa e trombogênese^{6,7,8}.

A Proteína C Reativa ultra-sensível (PCR-us) é o marcador de atividade inflamatória mais investigado no contexto da doença aterosclerótica coronariana e carotídea^{9,10,11}. Embora a PCR-us não tenha associação definida com aterosclerose carotídea inicial, avaliada pelo espessamento médio-intimal¹², níveis elevados de PCR-us têm sido correlacionados à presença de doença aterosclerótica extracraniana¹³, à predição de eventos isquêmicos cerebrais na população geral¹⁴ e à instabilidade clínica na doença carotídea¹⁵. Resposta auto-imune ativada, demonstrada pela elevação de anticorpos anticardiolipina, anti- β 2 glicoproteína e antiproteínas de choque térmico (Hsp),

também tem sido demonstrada em pacientes com placas na bifurcação da carótida^{16,17,18}.

A caracterização morfológica detalhada da placa de ateroma carotídea se tornou possível nos últimos anos, particularmente por grandes avanços nas técnicas de métodos de imagem não-invasivos¹⁹. Diversos estudos indicam que o conteúdo de baixa ecogenicidade, o afilamento da capa fibrosa e irregularidades na superfície endotelial caracterizam placas potencialmente instáveis^{20,21}, especialmente se associados a baixo grau de calcificação^{22,23}. Recentemente, a ressonância nuclear magnética (RNM) de alta resolução permitiu a visualização *in vivo* de áreas de hemorragia na camada média de placas carotídeas pela identificação de áreas de brilho acentuado (“sinal hiperintenso”) em protocolos específicos^{24,25}. Embora a presença de sangramento no ateroma apresente excelente correlação com achados histológicos^{26,27}, seu significado clínico e sua associação com marcadores de atividade imunoinflamatória ainda não estão completamente elucidados.

Neste estudo prospectivo, avaliamos pacientes consecutivos com indicação de endarterectomia carotídea, que se submeteram simultaneamente à avaliação morfológica da placa de ateroma carotídea por RNM de alta resolução, e aferição de características clínicas e marcadores séricos imunoinflamatórios de vulnerabilidade, além de estudo histopatológico da placa. Nosso objetivo principal foi o de estudar potenciais associações entre a presença de hemorragia intraplaca avaliada por RNM e demais marcadores clínicos de vulnerabilidade carotídea.

MÉTODOS

Pacientes

Foram incluídos no estudo pacientes portadores de doença ateromatosa de carótida, com indicação cirúrgica definida pelos seus respectivos médicos assistentes, de acordo com critérios internacionalmente aceitos^{28,29}. Os pacientes foram arrolados entre dezembro de 2004 e dezembro de 2005, no Serviço de Cirurgia Cardiovascular do Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Pacientes com doenças infecciosas, inflamatórias ou auto-imunes conhecidas, aqueles com contra-indicação à realização de ressonância nuclear magnética, ou cuja placa aterosclerótica tenha sido considerada tecnicamente inadequada para análise histológica não foram incluídos no presente estudo. Foram igualmente excluídos casos com doença arterial periférica grave (dor em repouso, lesões cutâneas isquêmicas ou gangrena), pacientes com síndromes coronarianas agudas e aqueles submetidos a intervenções cirúrgicas ou percutâneas nos últimos 90 dias. O presente protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética de nossa instituição e todos os pacientes assinaram Termo de Consentimento Informado antes de participarem no estudo.

Caracterização Clínica

Os pacientes foram classificados, previamente a cirurgia, de acordo com a presença e tempo de evolução das manifestações neurológicas, definida em avaliação por neurologista (M.F.) que desconhecia os dados da RNM, bem como o perfil de marcadores séricos. Pacientes foram classificados como (1)

estáveis, quando fossem assintomáticos ou apresentassem sintomas hemisféricos ipsilaterais há mais de 90 dias; ou (2) instáveis, quando foram identificados sintomas hemisféricos ipsilaterais nos últimos 90 dias.

Ressonância Nuclear Magnética

Todos os exames de RNM foram realizados no aparelho Siemens Magnetom Vision Plus (Siemens®, Inc., Erlangen, Alemanha), com os pacientes acordados, utilizando-se a mesma janela de aquisição das imagens, em duas etapas distintas: angiografia para definição do percentual de estenose, e seqüência de hipersuscetibilidade magnética, para detecção de áreas de hemorragia intraplaca.

A angiografia foi realizada por técnica convencional, em seqüências ponderadas de pulso 3D TOF (*time-of-flight*), correspondendo à fase sem contraste, e gradiente 3D *Turboflash*, relativa à fase contrastada (gadólíneo intravenoso). O percentual de estenose foi determinado pelos critérios do ensaio *NASCET*³⁰, a partir da relação entre o menor diâmetro da zona de estreitamento, e o maior diâmetro da carótida interna, distal à lesão. A graduação da estenose foi adaptada de Nederkoorn e cols³¹, com divisão em 3 categorias: estenose entre 50 e 69%, estenose entre 70 e 90%, e estenose acima de 90%.

A técnica de detecção das áreas de hemorragia foi similar à descrita por Moody e cols²⁴, objetivando identificar a presença de metahemoglobina na matriz extracelular. Utilizamos uma seqüência de pulso MPRAGE tridimensional, com os parâmetros 10,3 ms, 4 ms, e 1000 ms, de tempos de espera, ângulo de inclinação de 15°, em aquisição única. Esta combinação

produziu a amplificação do sinal na seqüência ponderada em T1, em áreas contendo hemorragia ou trombo recente, denominada de sinal hiperintenso. O sinal foi considerado positivo neste estudo, quando o brilho presente apresentava intensidade maior do que a produzida pelos tecidos moles adjacentes. As imagens foram adquiridas em plano coronal, com matriz de 140x256, campo de visão quadrado (*FOV*) de 30 cm, espessura de cortes de 1,07 mm, e posteriormente impressas em filme radiológico com a mesma janela de magnificação.

Os exames foram interpretados por dois examinadores independentes (J.R.H. e M.B.M.), que desconheciam os dados clínicos e laboratoriais, prevalecendo o percentual de maior de estenose, em casos de discordância. A impressão das imagens em filme radiológico foi realizada com a mesma magnificação, marcando-se a área correspondente à placa, com margem de 1,0 cm proximal e distal, para cruzamento correto com a histologia.

Marcadores Séricos

Na sala de cirurgia, antes da indução anestésica, 20 ml de sangue foram coletados em veia periférica e imediatamente enviados para processamento. A dosagem de PCR-us foi procedida pelo método de nefelometria Behring CardioPhase (Behring®, Inc., Marburg, Alemanha), utilizando anticorpo monoclonal para PCR-us humana, em alíquota de soro resfriado, conforme previamente descrito³². O resultado foi expresso em mg/dL, considerando-se elevado valor superior a 0,3¹¹. A detecção de anticorpos anticardiolipina IgG, IgM e IgA foi efetuada através de ensaio enzimático (ELISA – Inova Diagnostics®, Inc., San Diego, EUA), em alíquota de soro congelado a -70⁰ C,

conforme previamente descrito³³. Os resultados foram classificados de acordo com os seguintes parâmetros: IgG ou IgM - teste positivo quando maior de 20 UI; IgA - teste positivo quando maior de 15 UI. Anticorpos anti-β2 glicoproteína classes IgG, IgM e IgA foram detectados através de ensaio enzimático (ELISA – Inova Diagnostics®, Inc., San Diego, EUA), em alíquota de soro congelado a -70⁰ C, conforme previamente descrito³⁴. Os resultados foram expressos em UI de acordo com os seguintes padrões: IgG ou IgM - teste positivo quando maior de 20 UI; IgA - teste positivo quando maior de 25 UI. Anticorpos contra Hsp 60 humana recombinante e contra Hsp 65 de *Mycobacterium bovis*, foram detectados através de ELISA (Inova Diagnostics®, Inc., San Diego, EUA), em alíquota de soro congelado a -70⁰ C. Foram consideradas positivas para anticorpos IgG anti-Hsp 60 ou IgG anti-Hsp 65 as amostras que atingiram densidade óptica igual ou maior de 0,5³⁵.

Técnica Cirúrgica

Todos os pacientes foram operados em um tempo máximo de 15 dias após a indicação cirúrgica, pelo mesmo cirurgião (L.C.A.), sob anestesia geral, com intubação orotraqueal, e monitorização da pressão arterial média. A dissecação da bifurcação carotídea foi realizada por técnica habitual, evitando-se a hemostasia por compressão para limitar embolização ou desarranjo na arquitetura da placa. Após infusão de 1,0 mg/Kg de heparina por via intravenosa, procedeu-se a arteriotomia longitudinal anterior, com extensão suficiente para obter-se margem de parede arterial normal, com 1,0 cm cranial e caudal à lesão. O ateroma foi removido por descolamento e armazenado imediatamente em solução de formol a 10%. Após a retirada de fragmentos

residuais, foi realizada a arterioplastia, com reversão da anticoagulação com protamina, na dose de 1,0 mg/Kg por via intravenosa.

Análise Histológica

As peças foram fixadas em solução de formol a 10% e tingidas com nanquim em suas faces posterior e cranial, para evitar erros de conformação espacial, para posterior correlação com achados de RNM, como recomendado por Lovett e cols³⁶. Após descalcificação e inclusão em bloco de parafina, por técnica habitual, as amostras foram seccionadas em cortes de 10 µm de espessura, a cada 3,0 mm de extensão da peça, e corados com hematoxilina/eosina (HE) e tricrômico de Mallory (TM). A interpretação das lâminas foi realizada por patologista (A.A.M.) que desconhecia os dados clínicos e laboratoriais.

A caracterização da hemorragia intraplaca foi adaptada de Lusby e cols³⁷. Hemorragia aguda (menos de 1 semana) foi definida como presença de eritrócitos intactos ou com meta-hemoglobina intracelular, corados em tom laranja-vermelho no TM, associados a atividade focal de macrófagos. Hemorragia recente (entre 1 e 6 semanas) foi caracterizada como presença de eritrócitos lisados com metahemoglobina extracelular ou fragmentos hemorrágicos, corados em vermelho-marrom no TM, associados a aglomerados de macrófagos com hemossiderina, e células gigantes. Hemorragia antiga (mais de 6 semanas) foi classificada como presença de fragmentos de material amorfo com hemossiderina, corados em azul no TM e em rosa-brilhante na hematoxilina/eosina, associados à calcificação. Finalmente, nenhum dos achados anteriormente descritos caracterizou

ausência de hemorragia. Para fins de análise estatística, sangramento agudo e recente foram agregados e definidos como hemorragia intraplaca presente, bem como sangramento passado ou ausente também foram agregados e chamados de hemorragia intraplaca antiga ou ausente.

O estado da capa fibrosa foi classificado como proposto por Hatsukami e cols³⁸: (1) normal, com espessura igual ou maior de 0,25 μ , (2) fina, com espessura inferior a 0,25 μ , em qualquer ponto da análise, e (3) rota, com comunicação da luz com a matriz intersticial, em qualquer ponto, à exceção da linha de arteriotomia.

Correlação entre Achados de RNM e Histologia

No cruzamento de imagens entre RNM e histologia, de cada um dos pontos de secção transversa na placa, previamente estabelecidos a cada 3,0 mm, coletaram-se 4 lâminas, marcando-se os locais correspondentes no filme angiográfico da RNM, em plano coronal. As imagens da RNM foram então reconstruídas nos planos sagital e axial, na seqüência para visualização do sinal hiperintenso, e registradas em filme radiológico, em cada ponto de secção, com a mesma janela de magnificação. Cada filme de RNM foi comparado com o corte histológico correspondente, mantendo a orientação espacial das amostras, nos eixos ântero-posterior e crânio-caudal.

Análise Estatística

Variáveis contínuas com distribuição normal foram expressas como média \pm desvio padrão e comparadas pelo teste t de Student ou análise de variância. PCR-us sofreu transformação logarítmica, por não apresentar

distribuição normal, e também foi comparada com teste t de Student ou análise de variância. Variáveis categóricas estão expressas como freqüências e percentuais. Para comparações entre os diferentes grupos, empregou-se teste Chi-quadrado ou teste exato de Fischer. Para aferir a concordância entre diferentes métodos de avaliação da placa aterosclerótica, procedeu-se cálculo de coeficiente kappa. Um valor de p bicaudal menor que 0,05 foi considerado estatisticamente significativo. As análises foram realizadas no pacote estatístico SAS para Windows, versão 8.0.

RESULTADOS

Características dos Pacientes

Foram estudados 70 pacientes submetidos a endarterectomia no Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. A idade média dos pacientes foi de 66 ± 9 anos, sendo a maioria do sexo masculino (66%) e hipertensos (89%), além de 46% serem portadores de diabete melito e 27% tabagistas ativos. Quanto à história cardiológica progressiva, 26% referiam história prévia de angina de peito e 19% haviam sofrido infarto do miocárdio (IAM) no passado. História prévia de acidente vascular encefálico (AVE) ou acidente isquêmico transitório foi observada em 34% e 16% dos casos, respectivamente (Tabela 1). Na avaliação de neurologista “cego” para os demais achados, o quadro clínico neurológico foi considerado estável em 28 (40%) pacientes, sendo 19 (27%) assintomáticos e 9 (13%) com eventos isquêmicos ipsilaterais antigos; enquanto que 42 (60%) dos casos foram considerados instáveis. O tempo médio entre o surgimento

dos sintomas e a coleta da placa de ateroma, no grupo clinicamente instável, foi de 22 ± 11 dias (4 a 45 dias), sendo 15 casos (36%) com até 15 dias, 18 (43%) entre 16 e 30 dias, e 9 (21%) entre 31 e 45 dias. Não obstante termos arbitrado em até 90 dias o critério para designação do grupo clinicamente instável, todos os pacientes apresentavam manifestações com até 45 dias de evolução. Estatinas estavam sendo utilizadas pela quase totalidade dos pacientes (69[99%]) e 46(66%) casos também se encontravam em uso de algum tipo de antiagregante plaquetário (ácido acetilsalicílico, ticlopidina ou clopidogrel).

Achados de RNM

A angiografia convencional com gadolínio identificou 15 (21,5%) pacientes com estenose entre 50 e 69%, 15 (21,5%) pacientes com estenose entre 70 e 90%, e 40 (57%) pacientes com estenose acima de 90%. Na seqüência de hipersuscetibilidade magnética, identificamos sinal hiperintenso, sugestivo de hemorragia intraplaca, em 45 (64%) casos. Nenhuma característica clínica ou laboratorial rotineira identificou aqueles com sinais sugestivos de sangramento intraplaca na RNM, exceto pela história prévia de acidente isquêmico transitório. De forma interessante, todos os pacientes com acidente isquêmico transitório no passado apresentavam sinal hiperintenso, o qual demonstrou-se em 17 de 24 casos com acidente vascular encefálico remoto (Tabela 1). Em relação aos grupos definidos clinicamente, 91% dos casos com sinal hiperintenso positivo na RNM eram instáveis e 9% assintomáticos ou com sintomas neurológicos há mais de 90 dias ($p<0,001$ – Figura 1). A concordância entre os dois radiologistas que interpretaram as

RNMs foi excelente. Na avaliação da presença de sinal hiperintenso houve concordância entre os revisores em todos os casos; na avaliação do percentual angiográfico de estenose o coeficiente *kappa* foi de 0,95.

Achados Histopatológicos e Correlação com RNM

A capa fibrosa foi considerada com espessura maior de 0,25 μ em 46 pacientes (66%), menor de 0,25 μ em 21 (30%) e rota em 3 casos (4%). Hemorragia intraplaca foi descrita na análise histológica como aguda em 26 casos (37%), recente em 19 (27%), antiga em 2 (3%) e ausente em 23 pacientes (33%). A concordância entre o achado histológico de presença ou ausência de hemorragia aguda ou recente, com os achados de sinal hiperintenso na RNM foi excelente (coeficiente *kappa* de 0,91). Não observamos, entretanto, associação significativa entre presença de sinal hiperintenso com a espessura da capa fibrosa ($p=0,38$) ou grau de estenose carotídea ($p=0,92$ – Figura 2). As Figuras 3 e 4 demonstram exemplos de correlações entre RNM e dados histológicos.

Marcadores Séricos Imunoinflamatórios

Nos 70 casos estudados, PCR-us apresentou nível médio de $1,2 \pm 1,5$ mg/dL. Os valores de PCR-us foram essencialmente idênticos nos diferentes graus de estenose carotídea avaliada pela angiografia (Figura 5a), porém foram significativamente maiores nos pacientes clinicamente instáveis, quando comparados aos casos estáveis neurologicamente ($1,54 \pm 1,7$ versus $0,67 \pm 0,8$ mg/dL, respectivamente; $p = 0,006$). De forma similar, aqueles que apresentaram sinal hiperintenso na RNM também tinham níveis mais elevados

de PCR-us ($1,47 \pm 1,7$ versus $0,7 \pm 0,8$ mg/dL; $p=0,01$). Em adição, analisando a estratificação da PCR-us em quartis, observamos que 89% dos pacientes com sinal hiperintenso na RNM incluíam-se no quartil superior ($p=0,01$).

Em análise agregada, considerando características clínicas e achados de RNM, indicativos de instabilidade, houve incremento progressivo dos níveis de PCR-us ($p = 0,02$ – Figura 5b).

A positividade para anticorpos anticardiolipina, anti- $\beta 2$ glicoproteína e anti-Hsp 60 e 65, foi, respectivamente, de 9%, 45%, e 0%. Não observamos diferenças relevantes quanto a classe clínica, achados radiológicos ou histopatológicos entre casos com e sem positividade para estes marcadores.

DISCUSSÃO

O ateroma da bifurcação carotídea é causa de 20 a 30% dos casos de AVE isquêmicos, sendo o grau angiográfico de estenose o fator de predição consensualmente utilizado para indicação de intervenção cirúrgica. Entretanto, evidências recentes demonstram que a vulnerabilidade da placa de carótida não guarda relação com o caráter obstrutivo das lesões, mas se associa com a resposta imunoinflamatória e o desarranjo estrutural, molecular e bioquímico do ateroma^{6,8,39,40}. Neste contexto, nossos dados confirmam que a avaliação não invasiva da placa aterosclerótica carotídea pela RNM de alta resolução pode identificar de forma adequada suas alterações morfológicas e estruturais, em particular, a presença de hemorragia intraplaca. Além disto, demonstramos que este achado se associa com elevação de marcadores inflamatórios e com instabilidade de sintomas neurológicos.

Estudos prévios têm procurado demonstrar a correlação de níveis aumentados de PCR-us com a presença e a instabilidade da doença de cerebrovascular. O papel da PCR-us na predição de eventos foi estudada em uma coorte do estudo de *Framingham*, que correlacionou a incidência do primeiro episódio de AIT ou AVE com quartis séricos de PCR-us. Ao longo de 14 anos, observou-se que o quartil superior duplicou o risco relativo dos desfechos nos homens, e triplicou nas mulheres¹⁴. Wang e cols demonstraram que o desenvolvimento de placas na carótida interna, independente de existir doença clínica, também foi significativamente maior no quartil superior de PCR-us⁴¹. A associação entre PCR-us, espessamento médio-intimal da carótida e risco de AVE, foi prospectivamente avaliada em 5417 pacientes idosos no *Cardiovascular Health Study*⁴². Observou-se correlação fortemente positiva entre os níveis de PCR-us e AVE, no maior tercil de espessamento ($p < 0,02$), o que já havia sido demonstrado por Magyar e cols, estudando indivíduos mais jovens⁴³.

No presente estudo, avaliamos o comportamento dos níveis de PCR-us em pacientes submetidos a endarterectomia carotídea. Definimos instabilidade clínica como pacientes com AIT ou AVE ocorridos em até 90 dias de evolução, com o propósito de restringir este grupo a eventos diretamente ligados à vulnerabilidade da placa de carótida. Também foram excluídos das análises pacientes com evidência de doença aterosclerótica instável em outros sítios arteriais, como coronárias ou membros inferiores. Nossos resultados comprovam a relação já proposta entre elevação da PCR-us e instabilidade clínica, e pela primeira vez propõem uma associação entre níveis de PCR-us e características radiológicas de vulnerabilidade. Observamos que o nível de

PCR-us duplicou nos pacientes com sinal hiperintenso na RNM e que o quartil superior deste marcador apresentou 89% de positividade para identificação de hemorragia intraplaca ($p=0,01$). De forma similar, Garcia e cols investigaram recentemente a associação entre concentração plasmática de PCR-us, estrutura histológica e imunocitológica da placa de carótida. A média de PCR-us foi significativamente superior nos casos sintomáticos e nos classificados como instáveis à microscopia, demonstrando-se também uma correlação positiva com a infiltração de macrófagos e linfócitos T na placa¹⁵.

A expressão de auto-anticorpos na aterosclerose cerebral tem sido objeto recente de vários estudos, com resultados ainda controversos. A relação entre auto-anticorpos e infarto cerebral foi investigada por Staub e cols, em estudo de caso-controle envolvendo 185 pacientes. Os autores demonstraram que a maior positividade na titulação de anticorpos anti- $\beta 2$ glicoproteína e anti-Hsp 60 e 65 conferiu risco para a ocorrência de eventos clínicos⁴⁴. Na doença de carótidas, já foi proposta a expressão aumentada de anticorpos anti- $\beta 2$ glicoproteína nas regiões subendoteliais da placa, possivelmente indicando interação com células endoteliais, macrófagos e linfócitos¹⁶. Em estudo transversal, Xu e cols⁴⁵ dosaram anticorpos IgG contra proteína de choque térmico 65 (recombinante de micobactéria) em 867 indivíduos e compararam com achados de ultrassonografia. Houve correlação significativa entre títulos elevados de anticorpos e presença de placas nos pacientes acima de 60 anos, mesmo após controle dos demais fatores de risco. A magnitude clínica desta associação foi investigada pelos mesmos autores, constatando-se que a elevação dos anticorpos apresentou forte correlação com lesões evolutivas de carótida e foi fator preditivo de mortalidade tardia¹⁸. Em nosso estudo, houve

positividade de 45% nos anticorpos anti- β 2 glicoproteína, 9% nos anticorpos anticardiolipina, e nenhum caso positivo para anticorpos anti-Hsp 60 e 65. Não houve correlação entre positividade dos auto-anticorpos e sinal hiperintenso na RNM, nem foi observada diferença entre as classes clínicas. Nossos dados corroboram a dúvida da literatura científica de se os auto-anticorpos seriam de fato agentes pró-aterogênicos, ou apenas fenômenos coincidentes do processo aterosclerótico¹⁷.

Investigações recentes têm buscado identificar características morfológicas *in vivo* de placas vulneráveis de carótida. A validação destas técnicas se baseia em diversos estudos de correlação entre diferentes métodos de imagem e análises histológicas. A qualidade metodológica destas investigações foi recentemente questionada, em revisão sistemática de 73 estudos, dos quais apenas 23% avaliaram adequadamente a reprodutibilidade da aquisição da imagem, e em apenas 12% os métodos histológicos foram comparáveis entre si³⁶. Por isto, Lovett e cols sugerem recomendações rígidas no preparo e na interpretação das lâminas, como utilização de amostras representativas com número semelhante de casos com e sem sintomas, registro detalhado da relação temporal com a sintomatologia, aquisição da imagem sem retardo em relação a inclusão da peça histológica, cuidados na orientação espacial dos blocos, obtenção de cortes com no máximo 3 mm, e leitura cega dos resultados³⁶. Seguindo esta metodologia, nosso estudo conseguiu demonstrar correlação fortemente positiva entre presença de sinal hiperintenso e hemorragia intraplaca aguda ou recente (coeficiente *kappa* = 0,91). Em avaliação similar, Moody e cols observaram prevalência de sinal hiperintenso na RNM semelhante aquela que demonstramos, porém com

concordância histológica significativamente inferior²⁴. Nossos resultados concordam com estudo publicado recentemente por Chu e cols, que acrescentaram a seqüência ponderada em T2, no sentido de diferenciar hemorragia fresca, recente, ou antiga, demonstrando concordância moderada a forte com achados histológicos (coeficiente *kappa* = 0,7)²⁶. Embora a análise do estado da capa fibrosa pela RNM não tenha sido possível nos nossos protocolos, devido à seqüência de pulso utilizada, a presença do sinal hiperintenso não se associou a alterações da capa fibrosa à histologia, um achado não surpreendente. No entanto, é intrigante a observação de apenas 24 (57%) casos com afilamento e/ou ruptura da capa fibrosa à histologia, em um universo de 42 pacientes clinicamente instáveis. Este achado pode indicar o envolvimento de outros mecanismos promotores de desfechos clínicos, ligados ao sangramento da placa, porém sem ruptura franca da capa fibrosa. Nesse sentido, é plausível especular que mecanismos inflamatórios, mediados ou identificados por incrementos de PCR-us, possam estar envolvidos.

A ausência de correlação entre sinal hiperintenso e percentual angiográfico de estenose sintonizam com as evidências atuais de que os fenômenos de remodelamento positivo e excentricidade são preponderantes em relação ao caráter obstrutivo do ateroma, na gênese de eventos isquêmicos. Além disso, uma nova estimativa do risco de desestabilização doença carotídea, associando marcadores sistêmicos e métodos de imagem capazes de identificar atividade inflamatória ou pró-trombótica dentro da placa, como demonstrado em nosso estudo, tem sido recentemente sugerida, com possíveis implicações terapêuticas¹⁹. Atualmente, pode-se afirmar que a RNM

de alta resolução espacial, em modelos como o aqui utilizado, é o método de imagem com maior resolução e reprodutibilidade clínica⁴⁶.

Algumas considerações relacionadas ao delineamento e análises de nosso estudo devem ser registradas. A avaliação de outros marcadores séricos, como o complexo CD-40 ligante ou atividade da mieloperoxidase leucocitária, poderia potencialmente adicionar informações importantes de atividade inflamatória local e sistêmica. A amostra relativamente pequena, embora semelhante à de estudos similares, impede análises estratificadas dos dados, particularmente relacionada a outros aspectos histológicos. Finalmente, a seqüência de pulso utilizada na RNM não propiciou avaliação específica e detalhada da capa fibrosa.

Em conclusão, nossos achados demonstram que a presença de sinal hipertenso na RNM de alta resolução, na avaliação do sistema carotídeo de pacientes submetidos a endarterectomia carotídea, está associada à instabilidade de sintomas neurológicos e a elevação de marcadores sistêmicos inflamatórios. Este achado não se relacionou com o grau de estenose angiográfico ou com a espessura da capa fibrosa. Estes resultados, juntamente com evidências de diversas outras investigações correlatas, concordam com o conceito de que o grau estenose luminal no sistema carotídeo, à semelhança da circulação coronariana, não é um marcador adequado de vulnerabilidade do ateroma. Neste contexto, o corpo das evidências científicas contemporâneas sugere que outras características estruturais, moleculares e bioquímicas que participam do processo aterosclerótico, poderiam ser avaliadas prospectivamente em estudos futuros, como potenciais indicadores da necessidade de procedimentos terapêuticos no sistema carotídeo.

Tabela 1. Características Clínicas dos Pacientes

	Todos N = 70	RNM com Sinal Hiperintenso N = 45	RNM sem Sinal Hiperintenso N = 25	P
Idade, anos	66± 9.3	65± 8.9	66± 9.3	0,88
Sexo masculino, n (%)	46 (66)	31 (69)	15 (60)	0,45
Tabagismo, n (%)	19 (27)	10 (22)	9 (36)	0,46
HAS, n (%)	62 (89)	42 (93)	20 (80)	0,09
Diabetes, n (%)	32 (46)	20 (44)	12 (48)	0,77
Obesidade, n (%)	24 (34)	16 (36)	8 (32)	0,76
Angina estável, n (%)	18 (26)	12 (27)	6 (24)	0,81
IAM prévio, n (%)	13 (19)	8 (18)	5 (20)	0,82
CRM prévia, n (%)	14 (20)	10 (22)	4 (16)	0,53
AIT prévio, n (%)	11 (16)	11 (24)	0	0,007
AVE prévio, n (%)	24 (34)	17 (38)	7 (28)	0,41
Vasculopatia periférica, n(%)	33 (47)	23 (51)	10 (40)	0,37
FA, n(%)	3 (4)	3 (7)	0	0,19
PAS, mmHg	133±20	134±19	133±27	0,85
PAD, mmHg	79±12	79±12	80±11	0,81
Colesterol Total, mg/dL	174±50	171±56	179±38	0,55
LDL Colesterol, mg/dL	103±47	100±52	109±37	0,47
HDL Colesterol, mg/dL	42±18	44±22	38±7	0,08
Triglicerídeos, mg/dL	185±11	193±117	172±109	0,47

HAS – hipertensão arterial sistêmica; IAM – infartos agudos do miocárdio; CRM – cirurgia de revascularização miocárdica; AIT – acidente isquêmico transitório; AVE – acidente vascular encefálico; FA – fibrilação atrial; PAS – pressão arterial sistólica; PAD – pressão arterial diastólica; LDL – lipoproteína de baixa densidade; HDL – lipoproteína de alta densidade.

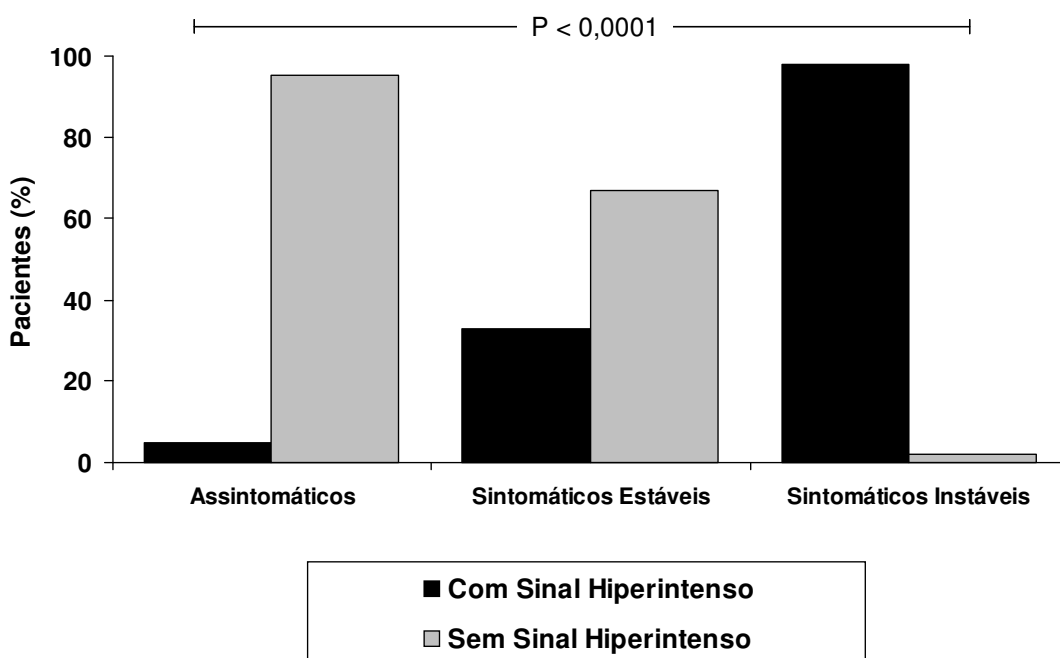


Figura 1. Correlação entre presença de sinal hiperintenso na ressonância nuclear magnética do sistema carotídeo e sintomas neurológicos.

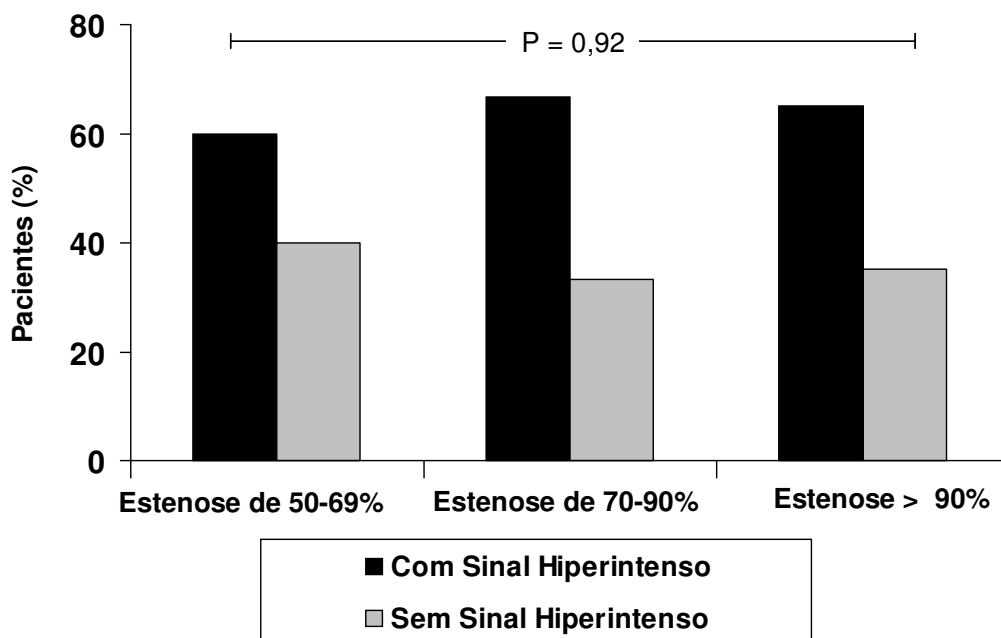


Figura 2. Associação entre presença de sinal hiperintenso e grau angiográfico de estenose, avaliados por ressonância nuclear magnética do sistema carotídeo.

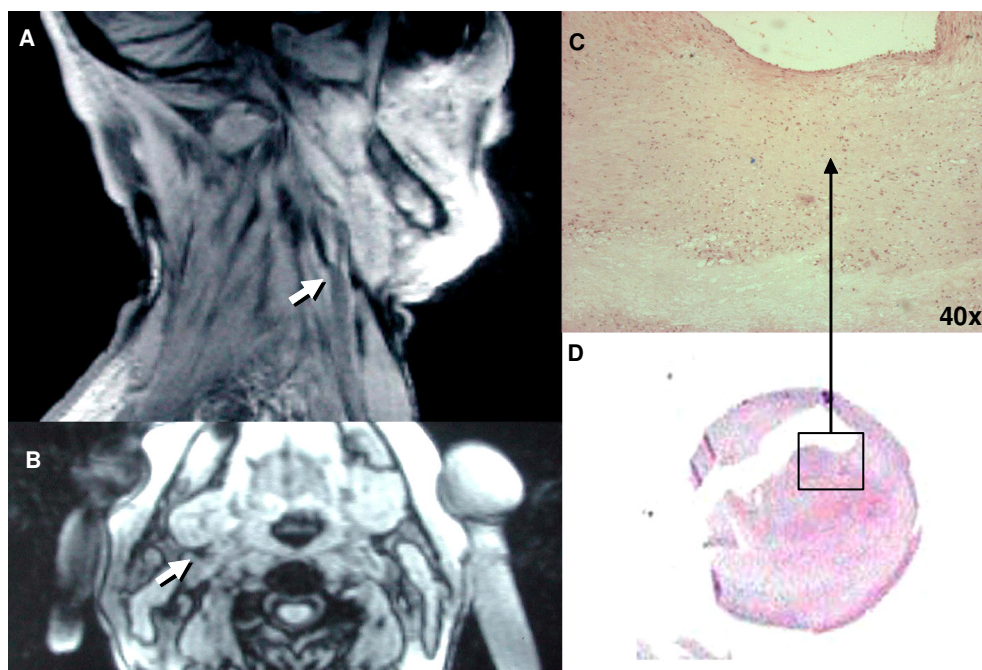


Figura 3. Ausência de sinal hiperintenso na ressonância nuclear magnética nos cortes sagital (A) e axial (B) Análise histológica demonstrando ausência de hemorragia em hematoxilina e eosina (C e D).

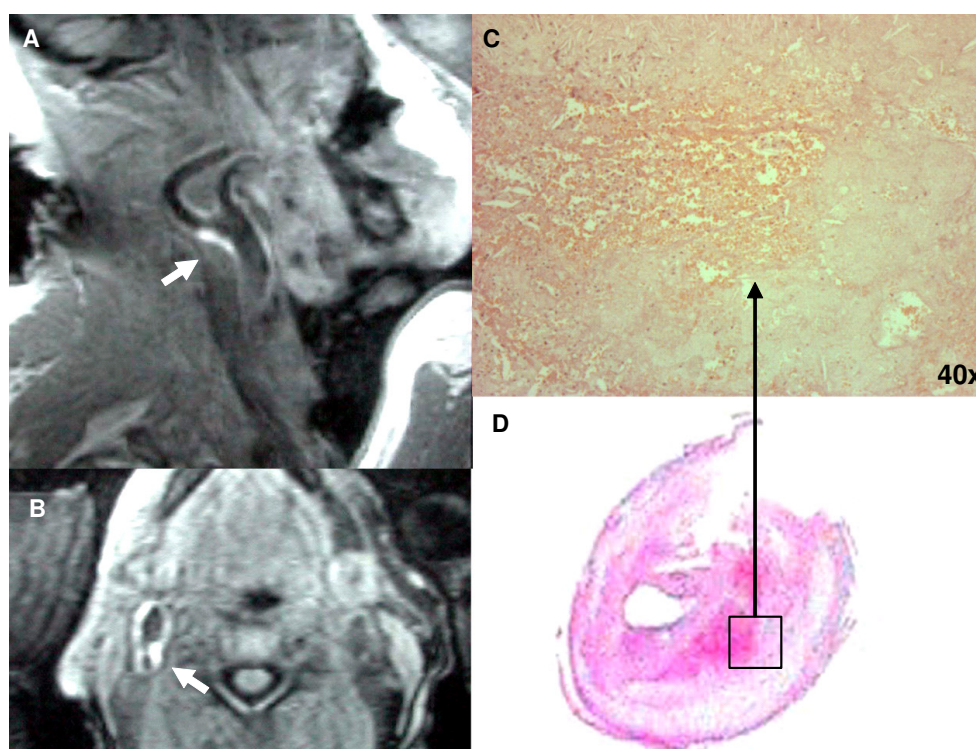


Figura 4. Presença de sinal hiperintenso na ressonância nuclear magnética nos cortes sagital (A) e axial (B) Análise histológica demonstrando presença de hemorragia em hematoxilina e eosina (C e D).

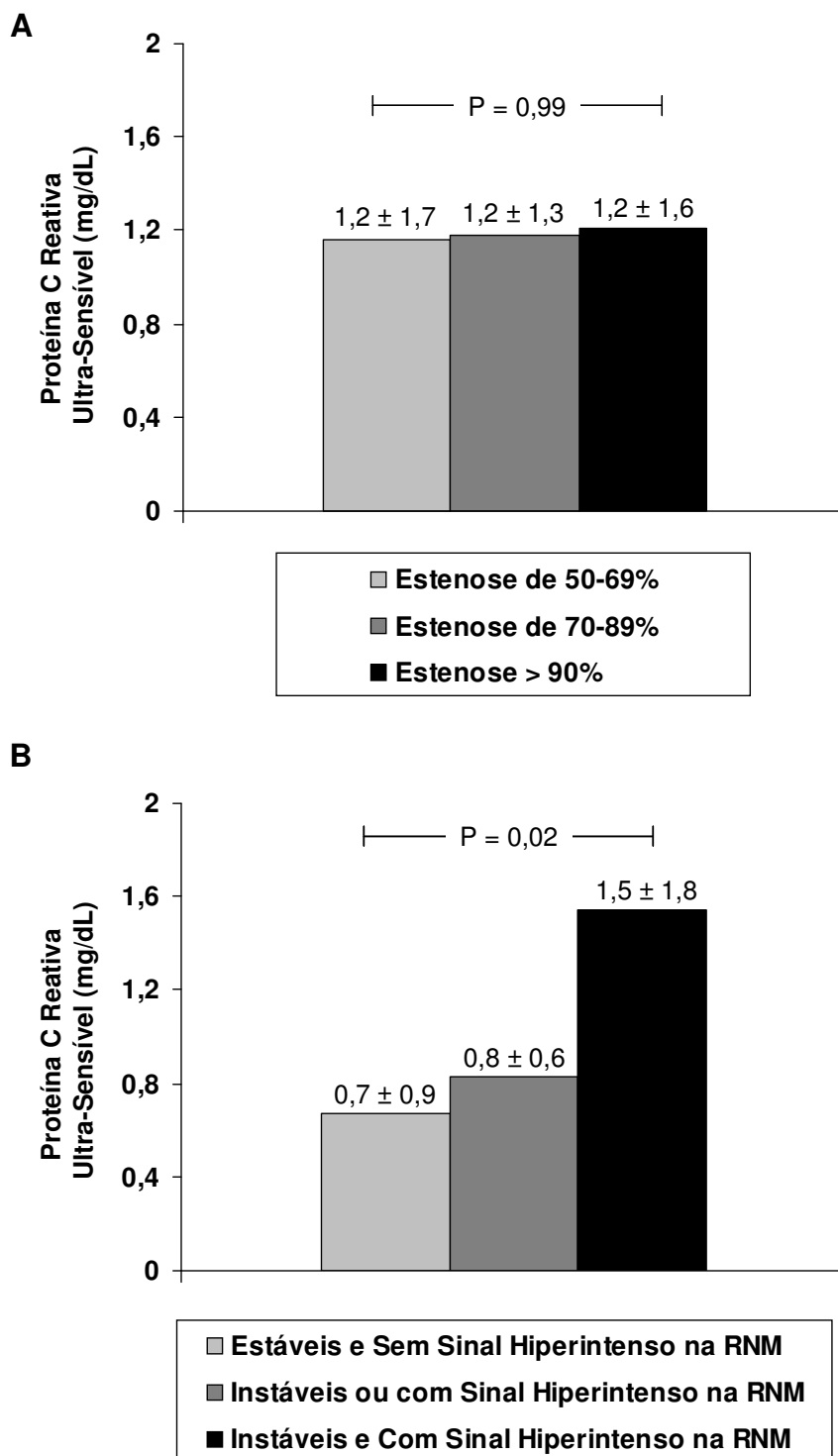


Figura 5. Distribuição dos níveis de Proteína C Reativa Ultra-Sensível nos diferentes graus de estenose carotídea (A) e de acordo com características clínicas e presença de sinal hiperintenso na ressonância nuclear magnética (B).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Hankey GJ. Stroke:how large a public health problem, and how can the neurologist help? Arch Neurol 1999;56:748-54.
- 2 Goldstein LB, Adams R, Becker K, Furberg CD, Gorelick PB, Hademenos G, et al. Primary prevention of ischemic stroke: a statement for healthcare professionals from the Stroke Council of the American Heart Association. Stroke 2001;32:280-99.
- 3 Guidelines for carotid endarterectomy. A multidisciplinary consensus statement from the Ad Hoc Committee of the American Heart Association. Circulation 1995;91:566-79.
- 4 Fuster V, Moreno PM, Fayad ZA, Corti R, Badimon JJ. Atherothrombosis and high-risk plaque. J Am Coll Cardiol 2005;46:937-54.
- 5 Mann JM, Davies MJ. Vulnerable plaque: relation of characteristics to degree of stenosis in human coronary arteries. Circulation 1996;94:928-31.
- 6 Rohde LE, Lee RT. Pathophysiology of atherosclerotic plaque development and rupture: an overview. Semin Vasc Med 2003;3:347-54.
- 7 Modifi R, Crotty TB, McCarthy P, Sheehan SJ, Mehigan D, Keaveny TV. Association between plaque instability, angiogenesis and symptomatic carotid occlusive disease. Br J Surg 2001;88:945-50.
- 8 Mullenix OS, Andersen CA, Starnes BW. Atherosclerosis as inflammation. Ann Vasc Surg 2005;19:130-8.

-
- 9 Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, Anderson JL, Cannon RO, Criqui M et al. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice. A statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation* 2003;107:499-511.
- 10 Koenig W. Predicting risk and treatment benefit in atherosclerosis: the role of C-reactive protein. *Int J Cardiol* 2005;98:199-206.
- 11 Biasucci LM. CDC/AHA Workshop on markers of inflammation and cardiovascular disease. Application to clinical and public health practice. Clinical use of inflammatory markers in patients with cardiovascular diseases. A background paper. *Circulation* 2004;110:e560-67.
- 12 Makita S, Nakamura M, Hiramori K. The association of C-reactive protein levels with carotid intima-media complex thickness and plaque formation in the general population. *Stroke*. 2005;36:2138-42.
- 13 Schillinger M, Exner M, Mlekusch W, Sabeti S, Amighi J, Nikowitsch R et al. Inflammation and Carotid Artery--Risk for Atherosclerosis Study (ICARAS). *Circulation*. 2005;111:2203-9.
- 14 Rost NS, Wolf PA, Kase CS, Kelly-Haes M, Silbershatz H, Massaro JM et al. Plasma concentration of C-reactive protein and risk of ischemic stroke and transient ischemic attack: the Framingham study. *Stroke* 2001;32:2575-9.

-
- 15 Garcia BA, Ruiz C, Chacon P, Sabin JÁ, Matas M. High-sensitivity C-reactive protein in high-grade carotid stenosis: risk marker for unstable carotid plaque. *J Vasc Surg* 2003;38:1018-24.
 - 16 George J, Harats D, Gilburd B, Afek A, Levy Y, Schneiderman J et al. Immunolocalization of β 2-glycoprotein1 to human atherosclerotic plaque: potential implications for lesions progression. *Circulation* 1999;99:2227-30.
 - 17 Sherer Y, Shoenfeld Y. Antiphospholipid antibodies: are they pro-atherogenic or an epiphenomenon of atherosclerosis? *Immunobiol* 2003;207:13-6.
 - 18 Xu Q, Kiechk S, Mayr M, Metzler B, Egger G, Oberhollezner F et al. Association of serum antibodies to heat-shock protein 65 with carotid atherosclerosis – clinical significance determined in a follow-up study. *Circulation* 1999;100:1169-74.
 - 19 Nighoghossian N, Derex L, Douek P. The vulnerable carotid artery plaque. Current imaging methods and new perspectives. *Stroke* 2005;36:2764-72.
 - 20 Tegos TJ, Sohail M, Sabetai M, Robless P, Akbar N, Pare G, Stansby G, Nicolaidis AN. Echomorphologic and histopathologic characteristics of unstable carotid plaques. *Am J Neuroradiol* 2000;21:1937-44.
 - 21 Gronholdt LM. Ultrasound and lipoproteins as predictors of lipid-rich, rupture-prone plaques in the carotid artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:2-13.

-
- 22 Nandalur KR, Baskurt E, Hagspiel KD, Phillips CD, Kramer CM. Calcified carotid atherosclerotic plaque is associated less with ischemic symptoms than is noncalcified plaque on MDCT. *AJR Am J Roentgenol* 2005;184:295-8.
- 23 Shaalan WE, Cheng H, Gewertz B, McKinsey JF, Schwartz LB, Katz D, et al. Degree of carotid plaque calcification in relation to symptomatic outcome and plaque inflammation. *J Vasc Surg* 2004;40:262-9.
- 24 Moody AR, Murphy RE, Morgan PS, Martel AL, Delay GS, Allder S et al. Characterization of complicated carotid plaque with magnetic resonance direct thrombus imaging in patients with cerebral ischemia. *Circulation* 2003;107:3047-52.
- 25 Murphy RE, Moody AR, Morgan PS, Martel AL, Delay GS, Allder S et al. Prevalence of complicated carotid atheroma as detected by magnetic resonance direct thrombus imaging in patients with suspected carotid artery stenosis and previous acute cerebral ischemia. *Circulation* 2003;107:3053-8.
- 26 Chu B, Kampschulte A, Ferguson M, Kerwin WS, Yarnykh VL, O'Brian KD et al. Hemorrhage in the atherosclerotic carotid plaque: a high-resolution MRI study. *Stroke* 2004;35:1079-84.
- 27 Kampschulte A, Ferguson MS, Kerwin WS, Nayak L, Polissar, Chu et al. Differentiation of intraplaque versus juxtaluminal hemorrhage/thrombus in advanced human carotid atherosclerotic lesions by in vivo magnetic resonance imaging. *Circulation* 2004;110:3239-44.

-
- 28 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;339:1415-25.
- 29 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.
- 30 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;325:445-53.
- 31 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;34:1324-32.
- 32 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;40:934-8.
- 33 Harris EN. The second international anticardiolipin standardization workshop: the Kingston Antiphospholipid Antibody Study (KAPS). *Am J Clin Pathol*. 1990;94:474-84.

-
- 34 Lewis S, Keil LB, Binder WL. Standardized measurement of major immunoglobulin class (IgG, IgA, IgM) antibodies to beta2-gpl in patients with antiphospholipid syndrome. *J Clin Lab Anal.* 1998;12:293-7.
- 35 Prohaska Z, Buda J, Horvath L, Csaszar A, Karadi I, Skebeni A et al. Comparative study on antibodies to human and bacterial 60 kDa heat shock proteins in a large cohort of patients with coronary heart disease and healthy subjects. *Eur J Clin Invest* 2001;31:285-92.
- 36 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;36:1091–7.
- 37 Lusby RJ, Ferrell LD, Ehrenfeld WK, Stoney RJ, Wylie EJ. Carotid plaque hemorrhage. Its role in production of cerebral ischemia. *Arch Surg* 1982;117:1479-88.
- 38 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;102:959-64.
- 39 Jander S, Sitzer M, Schumann R, Schroeter M, Siebler M, Steinmetz H et al. Inflammation in high-grade carotid stenosis. A possible role for macrophages and T cells in plaque destabilization. *Stroke* 1998;29:1625-30.
- 40 Gonçalves I, Moses J, Dias N, Pedro LM, Fernandes JF, Nilsson J et al. Changes related to age and cerebrovascular symptoms in the extracellular matrix of human carotid plaques. *Stroke* 2003;34:616-22.

-
- 41 Wang TJ, Nam B, Wilson PWF, Wolf PA, Levy D, Polak JF et al. Association of C-reactive protein with carotid atherosclerosis in men and women: the Framingham heart study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:1662-7.
- 42 Cao JJ, Thach C, Manolio TA, Psaty BM, Kuller LH, Chaves PH et al. C-reactive protein, carotid intima-media thickness, and incidence of ischemic stroke in the elderly: the Cardiovascular Health Study. *Circulation* 2003; 108:e9002-3.
- 43 Magyar Z, Szikszai Z, Balla J, Valikovics A, Kappelmayer J, Imre S, et al. Early-onset carotid atherosclerosis is associated with increased intima-media thickness and elevated serum levels of inflammatory markers. *Stroke* 2003; 34: 58-63.
- 44 Staub HL, Norman GL, Crowther T, da Cunha VR, Polanczyk A, Bohn JM et al. Antibodies to the atherosclerotic plaque components β 2-glycoprotein1 and heat-shock proteins as risk factors for acute cerebral ischemia. *Arq Neuropsiquiatr* 2003;61:757-63.
- 45 Xu Q, Willeit J, Marosi M, Kleindienst R, Oberhollechner F, Kiechl S et al. Association of serum antibodies to heat-shock protein 65 with carotid atherosclerosis. *Lancet* 1993;341:255-9.
- 46 Yuan C, Mitsumori LM, Beach KW, Maravilla KR. Carotid atherosclerotic plaque: noninvasive MR characterization of vulnerable lesions. *Radiology* 2001;221:285-99.

ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS

**Association between Intraplaque Haemorrhage assessed by
High-Resolution Nuclear Magnetic Resonance and Clinical,
Histopathological and Serological Characteristics in Patients
Submitted to Carotid Endarterectomy**

Luciano Cabral Albuquerque, MD, MSc¹

Luciane Barreneche Narvaes, MD¹

Aluísio Antunes Maciel, MD²

Henrique Staub, MD, ScD³

Maurício Friedrich, MD, ScD⁴

João Rubião Hoefel Filho, MD, ScD⁵

Maurício Barreira Marques, MD⁵

Luis Eduardo Rohde, MD, ScD⁶

- ✓ Division of Adult Cardiovascular Surgery¹, Pathology², Reumatology³, Neurology⁴ and Center for Diagnostic Imaging⁵ from São Lucas Hospital of the Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul.
- ✓ Cardiology Division from Hospital de Clínicas de Porto Alegre⁶.
- ✓ Postgraduate Program in Cardiology and Cardiovascular Sciences of the Federal University of Rio Grande do Sul^{1,6}

SUMMARY

Introduction – Assessment of bleeding in the atheroma of the carotid artery system can be performed by high-resolution nuclear magnetic resonance imaging (MRI). The clinical significance of this finding and its association with immunoinflammatory activity markers are not completely defined.

Methods – We studied consecutive patients submitted to carotid endarterectomy, with simultaneous assessment of plaque morphology by high-resolution MRI and evaluation of clinical characteristic, serum immunoinflammatory markers and histological study. Intraplaque haemorrhage was determined by the presence of hyper-intense signal at MRI.

Results – We studied 70 patients with an average age of 66 ± 9 years, predominantly males (66%) and hypertensive (89%). MRI angiography identified 15 (21.5%) patients with stenosis between 50 and 69%, 15 (21.5%) with stenosis between 70 and 90%, and 40 (57%) with stenosis $> 90\%$. High-resolution MRI showed a hyper-intense signal in 45 (64%) of cases. No clinical, laboratory or angiographic characteristic led to the identification of those patients with signs of intraplaque bleeding at the MRI, except the history of previous transient ischemic attack. High-sensitive C-reactive protein levels were similar in different degrees of carotid stenosis assessed by angiography, but they were significantly higher in clinically unstable patients ($p=0.006$) and in those with a positive hyper-intense signal at MRI ($p=0.01$). In an aggregated analysis where clinical characteristics and MRI findings were considered indicators of plaque vulnerability, we found a progressive increase of high-sensitive C-reactive protein levels ($p=0.02$).

Conclusions – Intraplaque haemorrhage evaluated by MRI identifies neurologically unstable patients, with increased immunoinflammatory activity, regardless of the degree of carotid stenosis.

Key-Words – atherosclerosis, haemorrhage, carotid artery, inflammation

INTRODUCTION

Occlusive cerebral vascular disease is a major cause of morbidity and mortality of adult population, constituting a public health priority worldwide^{1,2}. Atherothrombosis of carotid bifurcation is responsible for approximately 30% of cerebral ischemic episodes and carotid endarterectomy is considered the preferred treatment for selected patients in whom intervention is indicated³. Although current indications of carotid endarterectomy are based on angiographic interpretation of luminal stenosis, several clinical and histopathological evidences indicate that acute vascular events occur mostly due to rupture of vulnerable plaques^{4,5}. In this context, atheroma vulnerability, most of the times is not related to the occlusive nature of the atheroma, depending on factors such as systemic immuno response, structural unbalance of the extra cellular matrix, apoptosis, intraplaque haemorrhage, rupture of the fibrous cap and thrombogenesis^{6,7,8}.

High-sensitive C-reactive protein (hs-CRP) is the most commonly investigated serum inflammatory marker of coronary and carotid artery atherosclerotic disease^{9,10,11}. Although no definite association has been found between hs-CRP and initial carotid atherosclerosis, assessed by intimal-medial thickness¹², high levels of hs-CRP has been associated to the presence of extracranial atherosclerotic disease¹³, to the prediction of cerebral ischemic events in the general population¹⁴ and to the clinical instability of the carotid artery disease¹⁵. Similarly, activation of an auto-immune response, identified by the increase of the anticardiolipin, anti-glycoprotein β 2 and anti heat-shock

proteins (Hsp) antibodies, has also been demonstrated in carotid bifurcation plaques^{16,17,18}.

Detailed morphological characterization of the carotid atheroma was made possible over the last few years, particularly due to great advances in noninvasive imaging techniques¹⁹. Several studies indicate that the low ecogenicity content, fibrous cap thinning and endothelial surface abnormalities characterize potentially unstable plaques^{20,21}, specially when low degree of calcification is also present^{22,23}. Recently, high-resolution magnetic resonance imaging (MRI) allowed *in vivo* imaging of areas of haemorrhage in the medial layer of carotid artery plaques by identification of segments with intense brightness (“hyper-intense signal”) in specific MRI protocols^{24,25}. Although the occurrence of bleeding in the atheroma has an excellent correlation to histological findings^{26,27}, its clinical meaning and its association with immunoinflammatory markers are not yet completely clarified.

In this prospective study we assessed consecutive patients with indication for carotid endarterectomy who simultaneously underwent morphological evaluation of the carotid atheroma by high-resolution MRI and assessment of clinical characteristics and serum immunoinflammatory markers, including histopathology study of the plaque. Our main objective was to evaluate potential associations between the occurrence of intraplaque haemorrhage assessed by MRI and other clinical markers of carotid vulnerability.

METHODS

Patients

This study enrolled patients with definite carotid atheromatous disease and clear indication of carotid endarterectomy defined by the attending physician, according to internationally accepted criteria^{28,29}. Patients were selected between December 2004 and December 2005, at the Cardiovascular Surgery Division of Hospital São Lucas 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 were not included in the present study. 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 over the last 90 days were also excluded. The present protocol was approved by the Ethics Committee of our institution and all patients signed an Informed Consent Form before the beginning of the study.

Clinical Characterization

All patients were classified according to the presence and evolution of neurological symptoms, assessed by a neurologist (M.F.) who was unaware of MRI data, as well as of other clinical variables. Patients were classified as (1) stable, when asymptomatic or when showing ipsilateral hemispheric symptoms for more than 90 days; or (2) unstable, when ipsilateral hemispheric symptoms were identified during the last 90 days.

Magnetic Nuclear Resonance

All MRI exams were performed on a Siemens Magnetom Vision Plus apparatus (Siemens®, Inc., Erlangen, Germany). Patients were awoken and the same image window acquisition was used in two different stages: angiography to determine luminal stenosis and magnetic hypersusceptibility sequence to detect areas of intraplaque haemorrhage.

Angiography 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* criteria³⁰ 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 and cols³¹, divided into three categories: stenosis between 50 and 69%, stenosis between 70 and 90% and stenosis higher than 90%.

The technique to detect areas of haemorrhage was similar to the protocol described by Moody and cols²⁴, with the purpose of identifying the presence of metahemoglobin in the extracellular matrix. We used a tridimensional MPRAGE pulse sequence, with 10.3 ms, 4 ms and 1000 ms parameters of waiting time, (angle inclination of 15°), in a unique acquisition. This combination produced the signal amplification in the T1 weighted sequence, in areas containing recent thrombus or haemorrhage identified by the hyper-intense signal. Whenever the brightness was more intense than the one produced by the adjacent soft tissues, the signal was considered positive in the present study. The images

were acquired in coronal plan, with a 140x256 matrix, 30cm square field of view (FOV), depth of cuts of 1.07 mm and then printed on radiology film with the same magnification window.

Tests were interpreted by two independent examiners (J.R.H. and M.B.M.), who were not aware of clinical and laboratory data. The highest stenosis percentage prevailed in case of disagreement. The printing of images on radiology film was performed with the same magnification, and the plaque area was marked in the proximal and distal margin for adequate comparison to histology.

Serum Immunoinflammatory Markers

In the operation 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, Alemanha), where monoclonal antibodies to human CRP were used in a cooled serum aliquot, as previously described³². Results were expressed in mg/dL, a value > 0,3 mg/dL was considered to be high¹¹. Detection of anticardiolipin IgG, IgM and IgA antibodies was performed by an enzymatic assay (ELISA – Inova Diagnostics®, Inc., San Diego, EUA), in frozen (-70⁰ C) serum aliquots, as previously described³³. Results were classified according to the following parameters: IgG or IgM – positive when > 20 IU; IgA - positive when > 15 IU. Anti-β2 glycoprotein classes IgG, IgM and IgA antibodies were also detected by an enzymatic assay (ELISA – Inova Diagnostics®, Inc., San Diego, EUA), in frozen (-70⁰ C) serum aliquots, as previously described³⁴. Results were expressed in IU according to the following

standards: IgG or IgM – positive when > 20 IU; IgA – positive when > 25 IU. Antibodies against Hsp 60 recombinant human and against *Mycobacterium bovis* Hsp 65 were detected by ELISA (Inova Diagnostics®, Inc., San Diego, EUA), in frozen (-70⁰ C) serum aliquots. Samples that reached optical density equal to or higher than 0,5³⁵ were considered to be positive to IgG anti-Hsp 60 or IgG anti-Hsp 65 antibodies.

Surgical Technique

All patients were operated on within 15 days from surgical indication, by the same surgeon (L.C.A.) under general anesthesia, with orotracheal intubation and monitoring of mean arterial pressure. Dissection of carotid bifurcation was performed by the usual technique, avoiding haemostasis 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, 1.0 cm cranially and caudally to the lesion. The atheroma was removed by detachment and immediately stored in a 10% formol solution. After removal of plaque debris, reversion of anticoagulation with protamine was performed (1.0 mg/Kg IV).

Histological Analysis

Before infusion on formol solution, plaque specimens were dyed in nankeen in their posterior and cranial surfaces, to define spatial markers for later comparisons to MRI findings, as recommended by Lovett and cols³⁶. After decalcification and inclusion in a paraffin block, samples were sectioned (10

µm), every 3.0 mm of the histological block and stained with standard hematoxylin-eosin and Mallory trichromic (MT). Interpretation of hytopathology was performed by an experienced pathologist (A.A.M.) who was unaware of clinical and laboratory data.

Characterization of intraplaque haemorrhage was adapted from Lusby and cols³⁷. Acute haemorrhage (less than 1 week) was defined as the presence of intact erythrocytes or as intracellular metahemoglobin, identified as an orange-reddish coloring at MT, associated with focal macrophage activity. Recent haemorrhage (between 1 and 6 weeks) was characterized as the presence of lysed erythrocytes with extracellular metahemoglobin or haemorrhage fragments dyed as a red brownish color at MT, associated with macrophages agglomerations with hemosiderin and giant cells. Late haemorrhage (more than 6 weeks) was classified according to the presence of amorphous material fragments with hemosiderin dyed in blue at MT and in bright pink at hematoxylin-eosin staining, associated with calcification. Finally, none of the previously described findings characterized absence of haemorrhage. For statistical analysis, acute and recent bleeding were aggregated and defined as current intraplaque haemorrhage. Also, late or absent bleeding were also aggregated and defined as old or absent intraplaque haemorrhage.

Fibrous cap was classified according to Hatsukami and cols³⁸ as (1) normal, whenever its thickness was equal to or greater than 0.25µ, (2) thin, whenever its thickness was lower than 0,25µ at any point of analysis and (3) ruptured, with contact of the vascular lumen with the interstitial matrix at any point, except the arteriotomy line.

Correlation between MRI Findings and Histology

When comparing histology sections and MRI, from every point of the plaque cross section (previously established to be evaluated every 3.0 mm), 4 laminae were cut and the corresponding points on the angiographic film of the MRI were marked in coronal axis. MRI images were then reconstructed in sagittal and axial axis, in the sequence for evaluation of the hyper-intense signal and recorded on radiology films, with the same magnification window. Each MRI film was compared to the corresponding histological cut, with the same spatial orientation in the anterior-posterior and cranial-caudal axes.

Statistical Analysis

Continuous variables with normal distribution were expressed as average \pm standard deviation and compared using Student t test or analysis of variance (ANOVA). Hs-CRP underwent logarithmic transformation as it did not have a normal distribution and was also compared using the Student t test or ANOVA, with post-hoc analysis when appropriate. Categorical variables were expressed as frequencies and percentages. For comparisons between different groups, the Chi-square test or Fisher's exact test were used. To assess the agreement between different methods of evaluation of the atherosclerotic plaque we calculated the kappa coefficient. A bicaudal p value lower than 0.05 was considered statistically significant. Analyses were performed in the SAS for Windows statistical package (version 8.0).

RESULTS

Patients Characteristics

Seventy patients submitted to carotid endarterectomy at São Lucas Hospital of the Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul were studied. The average age of the patients was 66 ± 9 years, mostly males (66%) and hypertensive (89%). Also, 46% had diabetes mellitus and 27% were active smokers. Regarding previous cardiac morbidity, 26% reported a history of angina pectoris and 19% had suffered a myocardial infarction (MI) in the past. Previous history of a cerebral vascular attack (CVA) or transient ischemic attack (TIA) was found in 34% and 16% of the cases, respectively (Table 1). According to the blinded neurological evaluation, 28 (40%) patients were considered stable (19 [27%] asymptomatic and 9 [13%] had old ipsilateral ischemic strokes), while 42 (60%) of study subjects were considered unstable. The average time between the occurrence of symptoms and collection of the atheroma plaque in the clinically unstable group was 22 ± 11 days (4 to 45 days) distributed as follow: for 15 cases (36%) up to 15 days, for 18 (43%) patients between 16 and 30 days and in 9 (21%) between 31 and 45 days. Although the identification of the clinically unstable group was expected to occur in 90 days, all patients of this group were identified in up to 45 days of evolution. Statins were used by almost all the patients (69[99%]) and 46(66%) patients also used some sort of platelet inhibiting drugs (salicylic acid, ticlopidine or clopidogrel).

MRI Findings

Conventional angiography with gadolinium identified 15 (21.5%) patients with stenosis between 50 and 69%, 15 (21.5%) patients with stenosis between 70 and 90%, and 40 (57%) patients with stenosis higher than 90%. In the magnetic hypersusceptibility sequence a hyper-intense signal suggesting intraplaque haemorrhage was identified in 45 (64%) patients. No routine clinical or laboratory characteristic led to the identification of those patients with intraplaque bleeding signs at MRI, except by history of previous transient ischemic attack. Interestingly, all patients who had transient ischemic attack in the past showed the high bright signal, which was found in 17 of 24 patients who suffered remote encephalic vascular attack (Table 1). Concerning the clinically defined groups, 91% of the cases with a positive hyper-intense signal at MRI were unstable and only 9% were asymptomatic or had neurological symptoms for more than 90 days ($p < 0.001$ – Figure 1). There was an excellent agreement between both radiologists in MRI reading. In the assessment of the presence of hyperintensity there was concordance in interpretation of all cases; while the *kappa* coefficient was 0.95 in the assessment of the angiographic percent of stenosis.

Histopathological Findings and Correlation to MRI

Fibrous cap thickness was found to be greater than 0.25μ in 46 patients (66%), lower than 0.25μ in 21 (30%) and it was ruptured in only 3 cases (4%). Intraplaque haemorrhage was described in the histological analysis as acute in 26 cases (37%), recent in 19 (27%), old in 2 (3%) and absent in 23 patients (33%). There was excellent agreement between the histological finding of

presence or absence of acute or recent haemorrhage and the findings of hyper-intense signal at MRI (*kappa* coefficient of 0.91). However, no significant association between the presence of a positive hyper-intense signal at MRI and fibrous cap thickness ($p=0.38$) or carotid luminal stenosis ($p=0.92$ – Figure 2) was found. Figures 3 and 4 depicts examples of correlations between MRI and histological data.

Immunoinflammatory Serum Markers

Mean hs-CRP was 1.2 ± 1.5 mg/dL in the 70 cases studied. Hs-CRP levels were essentially identical in the different degrees of carotid stenosis assessed by angiography (Figure 5a), but they were significant higher in clinically unstable patients when compared to neurologically stable cases (1.54 ± 1.7 *versus* 0.67 ± 0.8 mg/dL, respectively; $p = 0.006$). Similarly, those patients who showed a positive hyper-intense signal at the MRI also had higher levels of hs-CRP (1.47 ± 1.7 *versus* 0.7 ± 0.8 mg/dL; $p=0.01$). In addition, analysing the stratification by quartiles of hs-CRP, we observed that 89% of patients with hyper-intense signal at MRI was included in the highest quartile ($p=0.01$).

In an aggregated analysis considering clinical characteristics and MRI findings, there was a progressive increase of hs-CRP levels ($p = 0,02$ – Figure 5b).

The presence of anticardiolipin, anti- $\beta 2$ glycoprotein and anti-Hsp 60 and 65 antibodies was respectively 9%, 45% and 0%. No relevant differences concerning clinical, radiological or histopathological findings among cases with or without these antibodies were identified in the current analysis.

DISCUSSION

Carotid bifurcation atheroma causes 20 to 30% of cerebral vascular accidents (CVA) and it is well-established that the degree of angiographic stenosis is the major determinant of surgical intervention. However, several recent evidences show that carotid plaque vulnerability is not related solely to the obstructive nature of the lesions, but is also associated to the immunoinflammatory response and to structural, molecular and biochemical disarrangements of the atheroma^{6,8,39,40}. In this context, our data confirm that non-invasive assessment of the carotid atherosclerotic plaque by high-resolution MRI can adequately identify its morphological and structural alterations, in particular the presence of intraplaque haemorrhage. Furthermore, we showed that this finding is associated to increases of serum inflammatory markers and instability of neurological symptoms.

Previous studies have assessed the association of hs-CRP levels and the presence and instability of cerebral vascular disease. The role of hs-CRP in the prediction of clinical events was studied in the *Framingham* cohort study. Data over the last 14 years indicate that the highest quartile of hs-CRP doubled the risk of cardiovascular events in men and tripled this risk in women¹⁴. Wang and cols showed that the development of plaques in the internal carotid, regardless of the existence of clinical disease, was also significantly greater in the highest quartile of hs-CRP⁴¹. Also, the association of hs-CRP, carotid intimal-medial thickness and CVA risk was prospectively assessed in 5417 elderly patients at the *Cardiovascular Health Study*⁴². A strong positive correlation between hs-CRP levels and CVA was found in the highest tertile of

thickening ($p < 0.02$), which had already been shown by Magyar and cols in a study of younger individuals⁴³.

In the present study we evaluated the behavior of hs-CRP levels in patients submitted to carotid endarterectomy. Clinical instability was defined as patients with TIAs or CVAs that occurred up to 90 days before the procedure, a time-frame that would suggest a direct association to vulnerability of the carotid plaque. We also excluded patients with evidence of unstable atherosclerotic disease in other arterial sites (coronary or peripheral arteries). Our results concur with the suggested relationship between hs-CRP and clinical instability, and for the first time suggest an association between hs-CRP levels and radiological characteristics of vulnerability. We observed that hs-CRP levels doubled in patients with a hyper-intense signal at MRI and that the highest quartile of this marker identified 89% of patients with intraplaque haemorrhage ($p = 0.01$). Similarly, Garcia and cols recently investigated the association between hs-CRP, histological and immunocytological structure of the carotid plaque. Hs-CRP was significantly higher in symptomatic patients and in those cases classified as microscopically unstable, demonstrating a positive correlation with the infiltration of macrophages and T lymphocytes in the plaque¹⁵.

The expression of auto-antibodies in cerebral atherosclerosis has been the object of several recent studies, with controversial results. The relationship between auto-antibodies and cerebral infarction was investigated by Staub and cols in a case-control study involving 185 patients. The authors demonstrated that the higher positiveness in the titration of anti- $\beta 2$ glycoprotein and anti-Hsp 60 and 65 antibodies implicated in increased risk of clinical events⁴⁴. The

expression of anti- β 2 glycoprotein in subendothelial regions of the atherosclerotic plaque in carotid disease was already proposed, possibly indicating interaction with endothelial cells, macrophages and lymphocytes¹⁶. In a cross-sectional study, Xu and cols⁴⁵ measured IgG antibodies against heat shock protein 65 (mycobacterium recombinant) in 867 subjects. There was a significant correlation between high titers of these antibodies and the presence of carotid plaques in patients over 60 years, even after adjustment for other known atherosclerotic risk factors. The clinical importance of this association was investigated by the same authors in a posterior analysis, in which they found a strong relationship between Hsp 65 antibodies, progressive carotid lesions and late mortality¹⁸. In our study, anti- β 2 glycoprotein antibodies were observed in 45% of patients, anticardiolipin antibodies in 9% and no positive cases for anti-Hsp 60 and 65 antibodies. There was no correlation between the presence of auto-antibodies and hyper-intense signal at MRI, nor was found any meaningful difference between clinical classes. Our data corroborate the uncertainty about the role of auto-antibodies as pro-atherogenic agents or merely as a coincident phenomena of the atherosclerotic process¹⁷.

Recent investigations have tried to identify *in vivo* morphological characteristics of the vulnerable carotid atheroma. The validation of these techniques is based on several correlation studies between different imaging techniques and histological analyses. The methodological quality of these investigations was recently questioned in a systematic review of 73 studies, where only 23% adequately assessed the reproducibility of image acquisition and in only 12% the histological methods were comparable. Thus, Lovett and cols suggest strict recommendations in the preparation of histological sections,

such as the use of representative samples with a similar number of symptomatic and asymptomatic cases, detailed registration of the temporal relationship with symptoms, image acquisition without significant delay in relation to histological analysis, careful spatial orientation of blocks, maximum 3 mm cuts and blinded reading of both results³⁶. According to this stringent methodology, our study demonstrated a strong positive correlation between the presence of a hyper-intense signal and acute or recent intraplaque haemorrhage (*kappa* coefficient = 0.91). Moody and cols found a similar prevalence of carotid intraplaque bleeding by high-resolution MRI in symptomatic patients, but with a significantly lower histological concordance²⁴. Our results agree with a report recently published by Chu and cols, which added the weighted sequence in T2, in order to distinguish fresh, recent or old haemorrhage. These authors observed a moderate to strong agreement with histological findings (*kappa* coefficient = 0.7)²⁶. Although we were unable to perform a detailed structural analysis of the fibrous cap by MRI due to the pulse sequence used, the presence of a hyper-intense signal was not associated to alterations of the fibrous cap histology. However, the fact that only 24(57%) of the clinically unstable patients showed thinning or rupture of the fibrous cap in histology is intriguing. This finding may indicate that other mechanisms not related to fibrous cap structure may be involved in the development of clinical events, that may be related to plaque bleeding. In this scenario, it is plausible to speculate that inflammatory processes mediated or identified by hs-CRP may be involved.

The absence of correlation between a hyper-intense signal at MRI and angiographic stenosis are in agreement with current evidences indicating that

the phenomena of positive remodeling and eccentricity are dominant in relation to the occlusive character of the atheroma in the genesis of ischemic strokes. In addition, new estimates of risk of carotid disease destabilization which associates systemic markers and imaging methods capable of identifying inflammatory or pro-thrombotic activity inside the plaque, as shown in our study, has been recently suggested, with potential therapeutical implications¹⁹. Based on this and several other findings, we can conclude that high-resolution MRI is the imaging technique with higher spatial resolution and clinical reproducibility⁴⁶.

Some considerations related to our study design and analyses must be done. The assessment of other serum markers, such as the CD-40 ligand complex or the leukocyte myeloperoxidase activity could potentially add important information concerning local and systemic inflammatory activity. The relatively small sample, though similar to other analogous studies, does not allow stratified analyses of data, particularly concerning histological aspects. Finally, the pulse sequence used in the MRI protocols did not allow specific and detailed evaluation of the fibrous cap structure.

In conclusion, our results demonstrate that the presence of a hyper-intense signal at a high-resolution MRI study of the carotid system of patients submitted to carotid endarterectomy is associated to the instability of neurological symptoms and to systemic inflammatory activity. This particular finding was not related to the degree of angiographic stenosis or to fibrous cap thickness. Such results, taken together with evidences from several other related investigations, are consistent with the concept that the luminal stenosis in the carotid system, similarly to the coronary tree, is not an adequate marker of atheroma vulnerability. In this scenario, contemporary scientific evidences

suggest that other structural, molecular and biochemical characteristics that participate in the atherosclerotic process deserve to be prospectively assessed in future studies as potential markers for a timely indication of therapeutical procedures in the carotid system.

Table 1. Clinical Characteristics

	All N = 70	With Hiper- Intense Signal N = 45	Without Hiper- Intense Signal N = 25	P value
Age, years	66± 9.3	65± 8.9	66± 9.3	0.88
Male, n (%)	46 (66)	31 (69)	15 (60)	0.45
Active smoking, n (%)	19 (27)	10 (22)	9 (36)	0.46
Hypertension, n (%)	62 (89)	42 (93)	20 (80)	0.09
Diabetes, n (%)	32 (46)	20 (44)	12 (48)	0.77
Obesity, n (%)	24 (34)	16 (36)	8 (32)	0.76
Previous stable angina, n (%)	18 (26)	12 (27)	6 (24)	0.81
Previous MI, n (%)	13 (19)	8 (18)	5 (20)	0.82
Previous CABG, n (%)	14 (20)	10 (22)	4 (16)	0.53
Previous TIA, n (%)	11 (16)	11 (24)	0	0.007
Previous CVA, n (%)	24 (34)	17 (38)	7 (28)	0.41
Peripheral artery disease, n(%)	33 (47)	23 (51)	10 (40)	0.37
AF, n(%)	3 (4)	3 (7)	0	0.19
SBP, mmHg	133±20	134±19	133±27	0.85
DBP, mmHg	79±12	79±12	80±11	0.81
Total Cholesterol, mg/dL	174±50	171±56	179±38	0.55
LDL Cholesterol, mg/dL	103±47	100±52	109±37	0.47
HDL Cholesterol, mg/dL	42±18	44±22	38±7	0.08
Triglicerides, mg/dL	185±11	193±117	172±109	0.47

MI – myocardial infarction; CABG– coronary artery bypass graft; TIA– transient ischemic attack; CVA – cerebral vascular attack; AF –atrial fibrillation; SBP– systolic blood pressure; DBP – diastolic blood pressure; LDL – low density lipoprotein; HDL – high density lipoprotein.

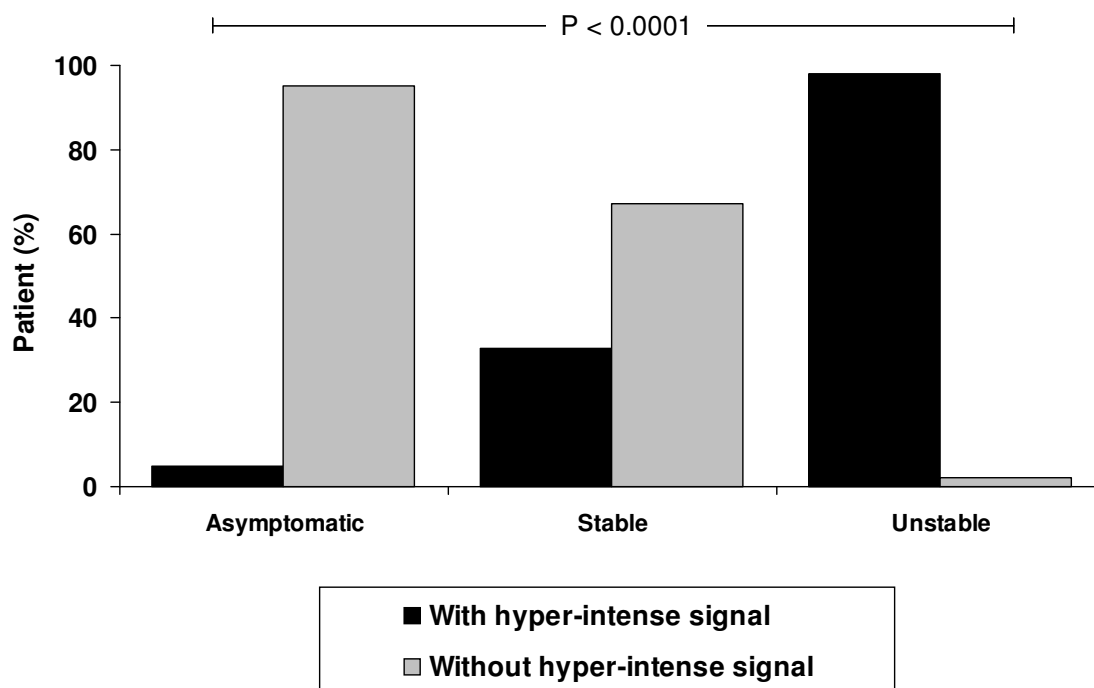


Figure 1. Correlation between hyper-intense signal and clinical neurological state.

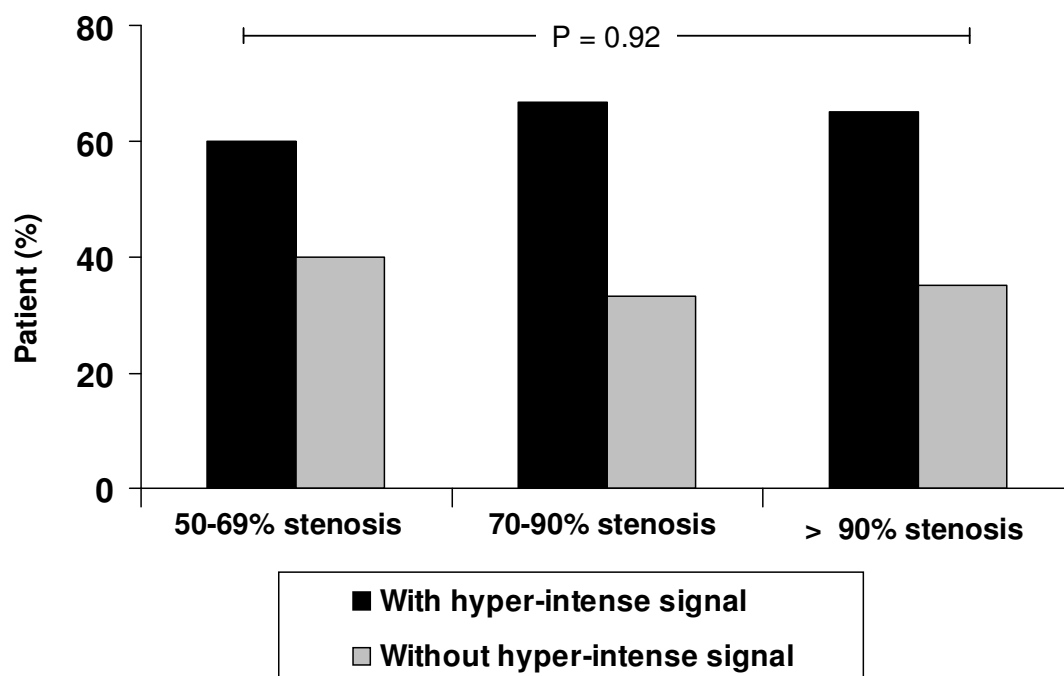


Figure 2. Association between hyper-intense signal and grade of angiographic stenosis.

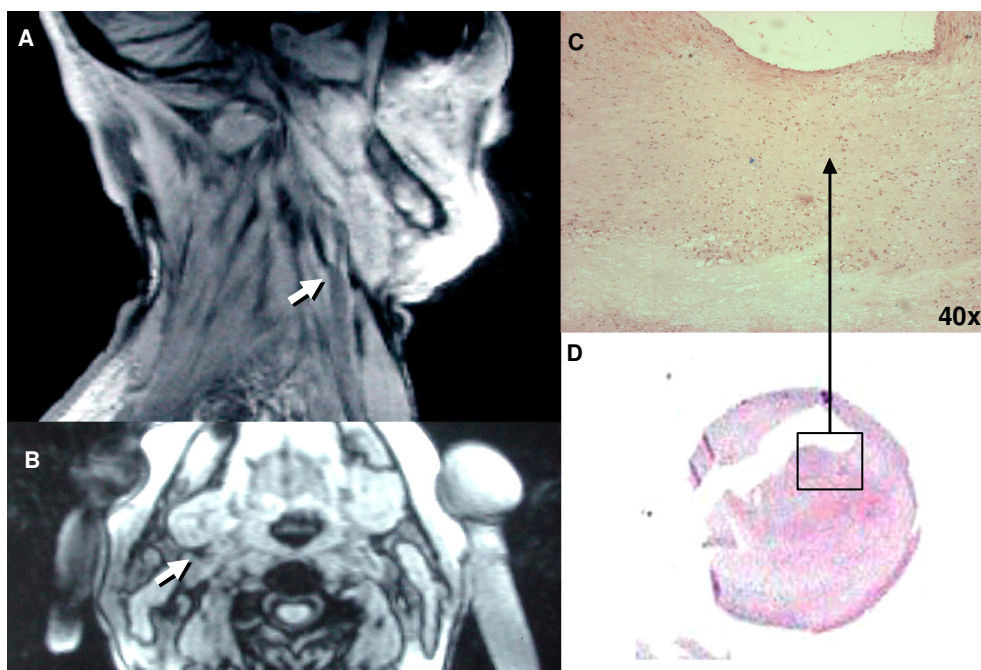


Figure 3. Absent of hyper-intense signal on sagittal (A) and axial view (B); Histological findings showing absent of intraplaque hemorrhage (C and D).

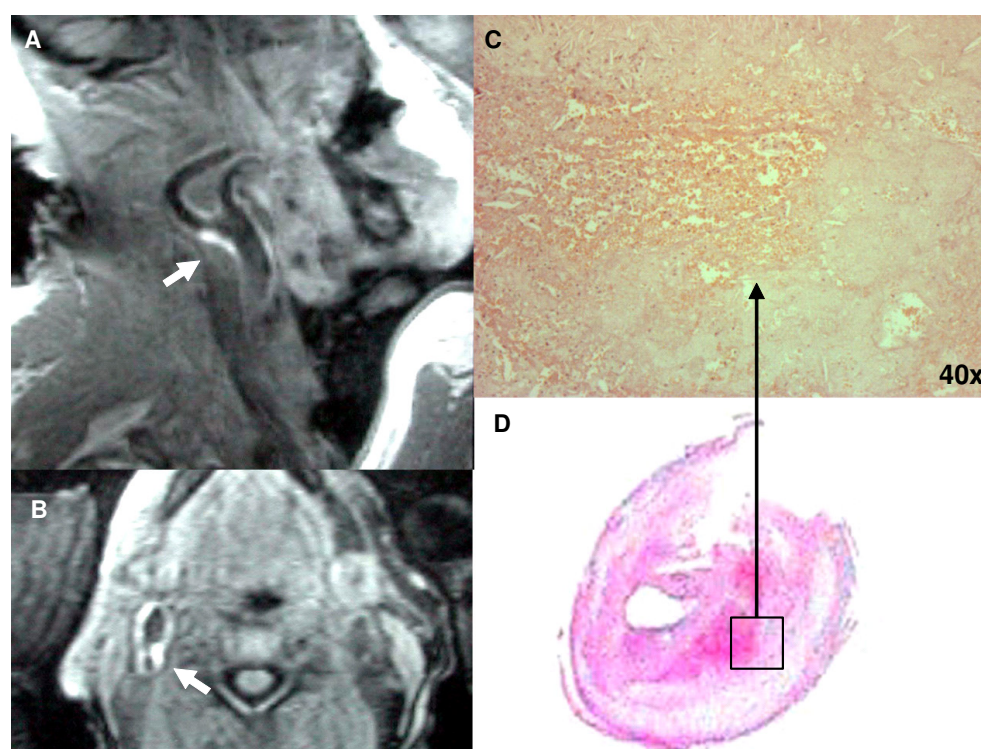


Figure 4. MRI showing hyper-intense signal on sagittal (A) and axial view (B); Intraplaque hemorrhage showed in histology (C and D).

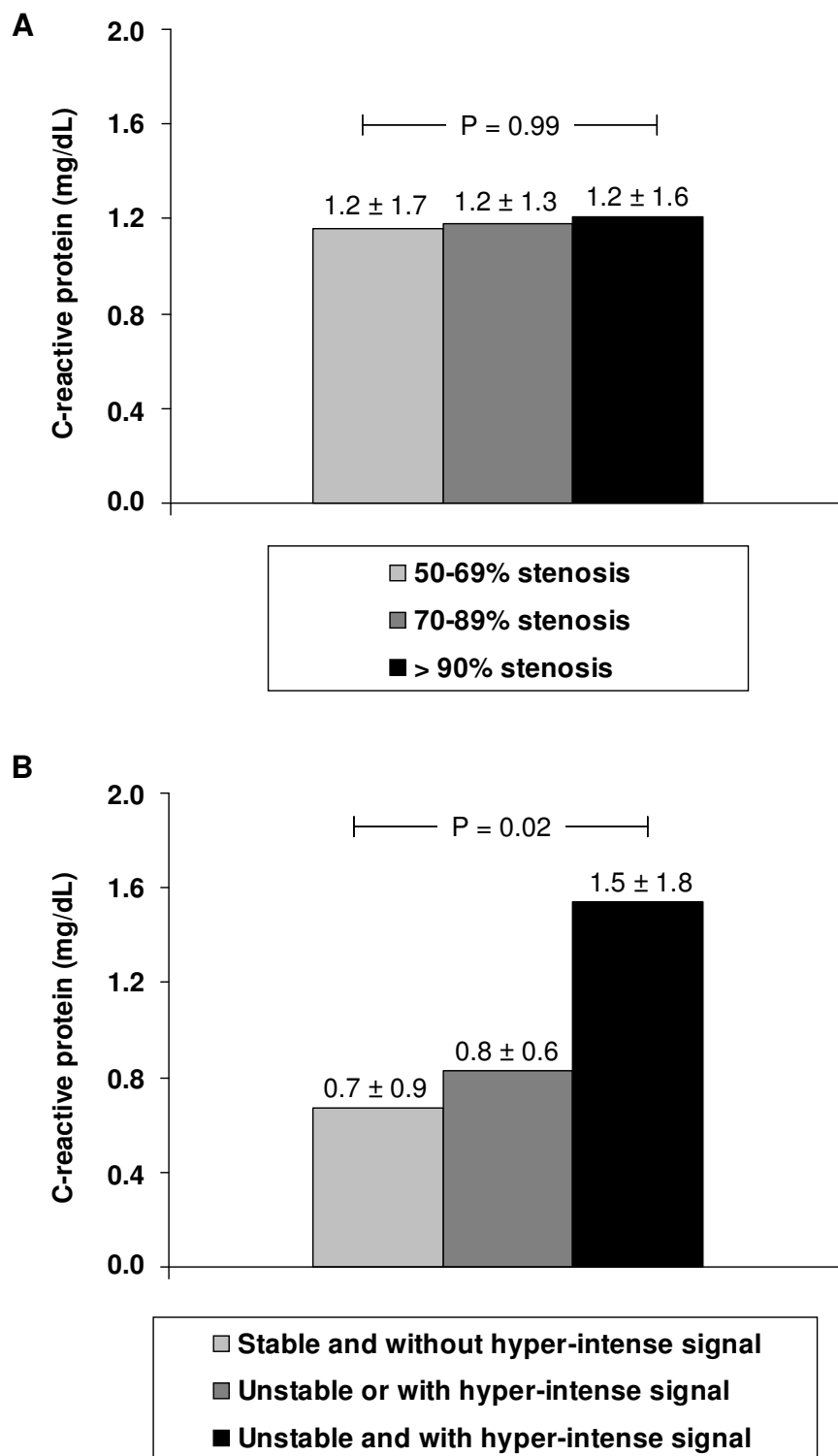


Figure 5. Distribution of CRP levels, in different carotid stenosis levels (A); and comparing with clinical characteristics and presence of hyper-intense signal at MRI (B).

REFERENCES

- 1 Hankey GJ. Stroke:how large a public health problem, and how can the neurologist help? Arch Neurol 1999;56:748-54.
- 2 Goldstein LB, Adams R, Becker K, Furberg CD, Gorelick PB, Hademenos G, et al. Primary prevention of ischemic stroke: a statement for healthcare professionals from the Stroke Council of the American Heart Association. Stroke 2001;32:280-99.
- 3 Guidelines for carotid endarterectomy. A multidisciplinary consensus statement from the Ad Hoc Committee of the American Heart Association. Circulation 1995;91:566-79.
- 4 Fuster V, Moreno PM, Fayad ZA, Corti R, Badimon JJ. Atherothrombosis and high-risk plaque. J Am Coll Cardiol 2005;46:937-54.
- 5 Mann JM, Davies MJ. Vulnerable plaque: relation of characteristics to degree of stenosis in human coronary arteries. Circulation 1996;94:928-31.
- 6 Rohde LE, Lee RT. Pathophysiology of atherosclerotic plaque development and rupture: an overview. Semin Vasc Med 2003;3:347-54.
- 7 Modifi R, Crotty TB, McCarthy P, Sheehan SJ, Mehigan D, Keaveny TV. Association between plaque instability, angiogenesis and symptomatic carotid occlusive disease. Br J Surg 2001;88:945-50.
- 8 Mullenix OS, Andersen CA, Starnes BW. Atherosclerosis as inflammation. Ann Vasc Surg 2005;19:130-8.

-
- 9 Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, Anderson, JL, Cannon RO, Criqui M et al. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice. A statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation* 2003;107:499-511.
- 10 Koenig W. Predicting risk and treatment benefit in atherosclerosis: the role of C-reactive protein. *Int J Cardiol* 2005;98:199-206.
- 11 Biasucci LM. CDC/AHA Workshop on markers of inflammation and cardiovascular disease. Application to clinical and public health practice. Clinical use of markers in patients with cardiovascular diseases. A background paper. *Circulation* 2004;110:e560-67.
- 12 Makita S, Nakamura M, Hiramori K. The association of C-reactive protein levels with carotid intima-media complex thickness and plaque formation in the general population. *Stroke*. 2005;36:2138-42.
- 13 Schillinger M, Exner M, Mlekusch W, Sabeti S, Amighi J, Nikowitsch R et al. Inflammation and Carotid Artery--Risk for Atherosclerosis Study (ICARAS). *Circulation*. 2005;111:2203-9.
- 14 Rost NS, Wolf PA, Kase CS, Kelly-Haes M, Silbershatz H, Massaro JM et al. Plasma concentration of C-reactive protein and risk of ischemic stroke and transient ischemic attack: the Framingham study. *Stroke* 2001;32:2575-9.

-
- 15 Garcia BA, Ruiz C, Chacon P, Sabin JÁ, Matas M. High-sensitivity C-reactive protein in high-grade carotid stenosis: risk marker for unstable carotid plaque. *J Vasc Surg* 2003;38:1018-24.
 - 16 George J, Harats D, Gilburd B, Afek A, Levy Y, Schneiderman J et al. Immunolocalization of β 2-glycoprotein1 to human atherosclerotic plaque: potential implications for lesions progression. *Circulation* 1999;99:2227-30.
 - 17 Sherer Y, Shoenfeld Y. Antiphospholipid antibodies: are they pro-atherogenic or an epiphenomenon of atherosclerosis? *Immunobiol* 2003;207:13-6.
 - 18 Xu Q, Kiechik S, Mayr M, Metzler B, Egger G, Oberhollechner F et al. Association of serum antibodies to heat-shock protein 65 with carotid atherosclerosis – clinical significance determined in a follow-up study. *Circulation* 1999;100:1169-74.
 - 19 Nighoghossian N, Derex L, Douek P. The vulnerable carotid artery plaque. Current imaging methods and new perspectives. *Stroke* 2005;36:2764-72.
 - 20 Tegos TJ, Sohail M, Sabetai M, Robless P, Akbar N, Pare G, Stansby G, Nicolaides AN. Echomorphologic and histopathologic characteristics of unstable carotid plaques. *Am J Neuroradiol* 2000;21:1937-44.
 - 21 Gronholdt LM. Ultrasound and lipoproteins as predictors of lipid-rich, rupture-prone plaques in the carotid artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:2-13.

-
- 22 Nandalur KR, Baskurt E, Hagspiel KD, Phillips CD, Kramer CM. Calcified carotid atherosclerotic plaque is associated less with ischemic symptoms than is noncalcified plaque on MDCT. *AJR Am J Roentgenol* 2005;184:295-8.
- 23 Shaalan WE, Cheng H, Gewertz B, McKinsey JF, Schwartz LB, Katz D, et al. Degree of carotid plaque calcification in relation to symptomatic outcome and plaque inflammation. *J Vasc Surg* 2004;40:262-9.
- 24 Moody AR, Murphy RE, Morgan PS, Martel AL, Delay GS, Allder S et al. Characterization of complicated carotid plaque with magnetic resonance direct thrombus imaging in patients with cerebral ischemia. *Circulation* 2003;107:3047-52.
- 25 Murphy RE, Moody AR, Morgan PS, Martel AL, Delay GS, Allder S et al. Prevalence of complicated carotid atheroma as detected by magnetic resonance direct thrombus imaging in patients with suspected carotid artery stenosis and previous acute cerebral ischemia. *Circulation* 2003;107:3053-8.
- 26 Chu B, Kampschulte A, Ferguson M, Kerwin WS, Yarnykh VL, O'Brian KD et al. Hemorrhage in the atherosclerotic carotid plaque: a high-resolution study. *Stroke* 2004;35:1079-84.
- 27 Kampschulte A, Ferguson MS, Kerwin WS, Nayak L, Polissar, Chu B et al. Differentiation of intraplaque versus juxtaluminal hemorrhage/thrombus in advanced human carotid atherosclerotic lesions by in vivo magnetic resonance imaging. *Circulation* 2004;110:3239-44.

-
- 28 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;339:1415-25.
- 29 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.
- 30 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;325:445-53.
- 31 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;34:1324-32.
- 32 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;40:934-8.
- 33 Harris EN. The second international anticardiolipin standardization workshop: the Kingston Antiphospholipid Antibody Study (KAPS). *Am J Clin Pathol.* 1990;94:474-84.

-
- 34 Lewis S, Keil LB, Binder WL. Standardized measurement of major immunoglobulin class (IgG, IgA, IgM) antibodies to beta2-gpl in patients with antiphospholipid syndrome. *J Clin Lab Anal.* 1998;12:293-7.
- 35 Prohaska Z, Buda J, Horvath L, Csaszar A, Karadi I, Skebeni A et al. Comparative study on antibodies to human and bacterial 60 kDa heat shock proteins in a large cohort of patients with coronary heart disease and healthy subjects. *Eur J Clin Invest* 2001;31:285-92.
- 36 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;36:1091–7.
- 37 Lusby RJ, Ferrell LD, Ehrenfeld WK, Stoney RJ, Wylie EJ. Carotid plaque hemorrhage. Its role in production of cerebral ischemia. *Arch Surg* 1982;117:1479-88.
- 38 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;102:959-64.
- 39 Jander S, Sitzer M, Schumann R, Schroeter M, Siebler M, Steinmetz H et al. Inflammation in high-grade carotid stenosis. A possible role for macrophages and T cells in plaque destabilization. *Stroke* 1998;29:1625-30.
- 40 Gonçalves I, Moses J, Dias N, Pedro LM, Fernandes JF, Nilsson J et al. Changes related to age and cerebral vascular symptoms in the extracellular matrix of human carotid plaques. *Stroke* 2003;34:616-22.

-
- 41 Wang TJ, Nam B, Wilson PWF, Wolf PA, Levy D, Polak JF et al. Association of C-reactive protein with carotid atherosclerosis in men and women: the Framingham heart study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:1662-7.
- 42 Cao JJ, Thach C, Manolio TA, Psaty BM, Kuller LH, Chaves PH et al. C-reactive protein, carotid intima-media thickness, and incidence of ischemic stroke in the elderly: the Cardiovascular Health Study. *Circulation* 2003; 108:e9002-3.
- 43 Magyar Z, Szikszai Z, Balla J, Valikovics A, Kappelmayer J, Imre S, et al. Early-onset carotid atherosclerosis is associated with increased intima-media thickness and elevated serum levels of markers. *Stroke* 2003; 34: 58-63.
- 44 Staub HL, Norman GL, Crowther T, da Cunha VR, Polanczyk A, Bohn JM et al. Antibodies to the atherosclerotic plaque components β 2-glycoprotein1 and heat-shock proteins as risk factors for acute cerebral ischemia. *Arq Neuropsiquiatr* 2003;61:757-63.
- 45 Xu Q, Willeit J, Marosi M, Kleindienst R, Oberhollechner F, Kiechl S et al. Association of serum antibodies to heat-shock protein 65 with carotid atherosclerosis. *Lancet* 1993;341:255-9.
- 46 Yuan C, Mitsumori LM, Beach KW, Maravilla KR. Carotid atherosclerotic plaque: noninvasive MR characterization of vulnerable lesions. *Radiology* 2001;221:285-99.

ANEXOS

Termo de Consentimento Informado Livre e Esclarecido

“Associação entre Marcadores Inflamatórios e Auto-anticorpos, Aspectos Morfológicos e Histológicos da Placa Aterosclerótica, e Apresentação Clínica, na Doença Obstrutiva Grave de Artérias Carótidas”

I- Justificativa e objetivos da pesquisa:

A circulação e o suprimento sangüíneo do cérebro se dá principalmente através das artérias carótidas, que estão situadas no pescoço, e levam o sangue proveniente do coração até o crânio. Doença obstrutiva de artérias carótidas (DOAC) significa a presença de placas de gordura (ateromas), que determinam entupimento progressivo da passagem do sangue ao nível destas artérias, e que se não tratadas podem causar o 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. Por outro lado, estudos recentes demonstram que na doença obstrutiva de coronárias, há um componente de inflamação que contribui para instabilidade da doença, aumentando a chance de angina de peito e de infarto do miocárdio, e que esta atividade inflamatória pode ser medida através de determinadas substâncias no sangue. . O objetivo deste trabalho é verificar se a presença destas substâncias inflamatórias e de anticorpos no sangue de pacientes com doença obstrutiva de carótidas, está associada a sinais de instabilidade da placa de ateroma e risco aumentado de derrame cerebral .

II-Os procedimentos a serem utilizados:

Nos pacientes com DOAC e possível indicação de endarterectomia de carótida, será realizada uma Ressonância Magnética da região cervical, mais propriamente das artérias carótidas, para determinar as características da placa de ateroma. Para verificarmos a presença dos marcadores de inflamação e dos anticorpos no organismo dos pacientes com DOAC, necessitaremos da coleta de 20 ml de sangue de veia periférica, no momento da cirurgia, no bloco cirúrgico. Será utilizada a mesma punção (agulha) que o anestesista utilizará para administrar a anestesia. Para a análise das características microscópicas da placa de ateroma, a mesma será armazenada após removida da artéria, fixada em formol, e submetida a exame subsequente.

III-Os desconfortos ou riscos esperados:

Poderá ocorrer desconforto ou fobia durante a Ressonância Magnética, com o que o exame será interrompido. Há um risco remoto (menor que 1%) de reações alérgicas ao contraste utilizado, que estão previstos quanto ao seu tratamento dentro da rotina desta unidade.

O paciente poderá apresentar dor no local da punção durante e após a coleta de sangue, que não seriam evitados sem este estudo, pois esta punção é essencial à anestesia para o procedimento cirúrgico.

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

IV-Os benefícios que se pode obter:

Se for confirmada a presença dos marcadores inflamatórios e dos anticorpos da aterosclerose no sangue dos pacientes com DOAC, e se esta presença estiver associada a determinadas características da placa de ateroma, na Ressonância Magnética e na análise microscópica, isto contribuirá para detectar-se com mais precocidade os casos de DOAC com risco de derrame cerebral, e um tratamento efetivo poderá então ser iniciado nestes pacientes.

V-Direitos do paciente:

- a) Garantia de resposta a qualquer pergunta;
- b) Liberdade de abandonar a pesquisa sem prejuízo para si;
- c) Garantia de privacidade.

VI-Atribuições do pesquisador:

- a) Compromisso com informação atualizada do estudo;
- b) Disponibilidade de tratamento médico e indenização em caso de danos;
- c) Garantia de que custos adicionais serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

Eu.....(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 o desejar. O Dr. Luciano Cabral Albuquerque (pesquisador 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, face a estas informações.

Fui informado 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 Dr. Luciano Albuquerque (pesquisador responsável) no telefone (OXX-51-3336-8190). Declaro que recebi cópia do presente Termo de Consentimento.

Assinatura do paciente

Nome

Data

Assinatura do pesquisador

Nome

Data

Este formulário foi lido para(nome do paciente) em.....(data) pelo (nome do pesquisador) enquanto eu estava presente.

Assinatura da testemunha

Nome

Data

FICHA DE AVALIAÇÃO CLÍNICA

Nº _____

Nome: _____ Prontuário: _____
 Sexo : Masculino Feminino Idade: _____
 Endereço: _____
 Telefone p/ contato: _____
 Data da internação: _____

Fatores de Risco CV:

Tabagismo [1] Ativo: ___ cigarros/dia [2] passado: fumou dos ___ anos até ___ anos { 3 } nunca funou
 [4] HAS
 [5] DM
 [6] História Familiar positiva (IAM ou morte súbita em homem < 55^a e mulher < 60^a)
 [7] Obesidade
 [8] Sedentarismo

História Cardíaca-Vascular:

[1] Angina estável [6] IAM prévio: Data: _____
 [2] Cateterismo : Data: _____ [7] ACTP [9] CRM : Data: _____
 [3] FA Paroxística [8] FA crônica
 [4] AIT prévios: Data: _____ Data: _____ Data: _____
 [5] AVC prévios: Data: _____ Data: _____ Data: _____

História Médica Progressiva:

[1] Doença vascular periférica [5] Doença Hepática leve [9] Doença Cerebrovasc. [13] Demência
 [2] Doença Tecido Conjuntivo [6] Doença hepática mod/grave [10] Úlcera
 [3] DM c/ lesão de órgão-alvo [7] Doença renal mod/grave [11] DPOC
 [4] Tumor sólido metastático [8] Neoplasia [12] AIDS

Fármacos na admissão (nome, doses em mg/dia):

1. AAS/ clopidogrel
2. Estatina
3. b-bloqueador
4. Nitrato
5. Captopril/Enalapril
6. Amiodarona
7. Diuréticos
8. Insulina/HGO
9. Hidralazina
10. Amlodipina
11. Diazepínico

Exame físico

PA 1: ____/____ mmHg PA 2: ____/____ mmHg Freq. Cardíaca: ____ bpm
 Peso: ____ Kg Altura: ____ cm IMC: ____

FICHA NEUROLÓGICA

1- Assintomático

2- Sintomático

2.1- AVE

2.2- AIT

* Tempo Evolução : dias

FICHA LABORATORIAL

1. Perfil Lipídico

Colesterol total _____ LDL _____ HDL _____ TG _____

2. Glicemia jejum _____

3. Hemoglobina glicosilada _____

4. PCR ultrasensível _____

5. Anticorpos Anticardiolipina _____

6. Anticorpos Anti- β 2 _____

7. Anticorpos Anti- Hsp 60 _____

8. Anticorpos Anti-Hsp 65 _____

FICHA ANGIOGRÁFICA

EXAMINADOR 1:

Percentual de estenose

1. 50% - 69%

2. 70% - 89%

3. 90% - 99%

Caracterização da placa

1. Com sinal hiperintenso

2. Com sinal hiperintenso

EXAMINADOR 2:

Percentual de estenose

1. 50% - 69%

2. 70% - 89%

3. 90% - 99%

Caracterização da placa

1. Com sinal hiperintenso

2. Com sinal hiperintenso

ANÁLISE HISTOLÓGICA

1. Peça cirúrgica

1. CID _____

2. CIE _____

2. Caracterização da placa

1. Capa Fibrosa normal

2. Capa Fibrosa fina

3. Capa Fibrosa rota

2. Hemorragia intraplaca

1. Hemorragia Aguda

2. Hemorragia Recente

3. Hemorragia Antiga

4. Sem Hemorragia

São José do Rio Preto, 4 de abril de 2006

Prezados senhores,

Vimos por intermédio desta informar que o trabalho "Vulnerabilidade da Doença Aterosclerótica de Carótidas: do Laboratório à Sala de Cirurgia – Parte 1", de autoria de Luciano Cabral Albuquerque, foi recebido e aceito para publicação na Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular (RBCCV) no volume 21.2 (abril-junho de 2006).

Atenciosamente,

A handwritten signature in black ink, reading "Domingo M Braile". The signature is written in a cursive, flowing style.

Domingo M Braile

Editor

RBCCV

São José do Rio Preto, 4 de abril de 2006

Prezados senhores,

Vimos por intermédio desta informar que o trabalho "Vulnerabilidade da Doença Aterosclerótica de Carótidas: do Laboratório à Sala de Cirurgia – Parte 2", de autoria de Luciano Cabral Albuquerque, foi recebido e aceito para publicação na Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular (RBCCV) no volume 21.3 (julho-setembro de 2006).

Atenciosamente,

A handwritten signature in black ink, reading "Domingo M Braile". The signature is written in a cursive, flowing style.

Domingo M Braile

Editor

RBCCV

São José do Rio Preto, 4 de abril de 2006

Prezados senhores,

Vimos por intermédio desta informar que o trabalho "*Vulnerabilidade da Doença Aterosclerótica de Carótidas: do Laboratório à Sala de Cirurgia – Parte 1*", de autoria de Luciano Cabral Albuquerque, foi recebido e aceito para publicação na Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular (RBCCV) no volume 21.2 (abril-junho de 2006).

Atenciosamente,



Domingo M Braile

Editor

RBCCV

São José do Rio Preto, 4 de abril de 2006

Prezados senhores,

Vimos por intermédio desta informar que o trabalho "*Vulnerabilidade da Doença Aterosclerótica de Carótidas: do Laboratório à Sala de Cirurgia – Parte 2*", de autoria de Luciano Cabral Albuquerque, foi recebido e aceito para publicação na Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular (RBCCV) no volume 21.3 (julho-setembro de 2006).

Atenciosamente,



Domingo M Braile

Editor

RBCCV