

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

**Marcadores de Disfunção Endotelial em Pacientes com Doença
Vascular Cerebral Isquêmica**

Aluna: Dra. Rosane Brondani

Orientadora: Profa. Dra. Nadine Clausell

Dissertação de Mestrado

2004

Agradecimentos

Agradeço a todos que de alguma forma direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste objetivo. De forma muito especial à minha família que sempre foi minha base de sustentação, ao meu marido, Luiz, e meu filho, Rafael, pelo apoio nos momentos difíceis e a compreensão pelos momentos de ausência. Ao grupo da Neurologia do Hospital Mãe de Deus, especialmente à colega Dra Sheila O. Martins. Ao Hospital de Clínicas de POA, de forma especial ao Serviço de Neurologia que disponibilizou o ambulatório de doenças cerebrovasculares onde foi realizado o seguimento dos pacientes. Ao colega, Dr. Luis Felipe Araújo, e de forma muito especial à acadêmica Denise Valente que além da coleta dos dados ajudou na formatação final do texto. Ao Dr Jarbas Oliveira pela sua competência e atenção ao realizar as análises por ELISA; à Dra Lucia Pellanda que realizou a análise estatística geral; ao Dr. Luis E. Rohde e Dra Carisi A. Polanczyk que nos ajudaram no refinamento da análise estatística; ao co-orientador, Dr Carlos R. M. Rieder por sua atenção e especialmente a minha orientadora, Dra Nadine Clausell, por ter aceitado o desafio de realizar um estudo dentro da área neurológica e principalmente pela sua paciência e dedicação, sem as quais isso tudo não teria sido concretizado.

Sumário

Introdução.....	01
Revisão da Literatura.....	02
- <i>Patogênese da aterosclerose</i>	02
- <i>Disfunção endotelial</i>	05
- <i>Ativação endotelial e adesão de células inflamatórias</i>	09
- <i>Mediadores inflamatórios</i>	14
- <i>Determinação de disfunção endotelial e de atividade inflamatória associada à doença cardiovascular</i>	15
- <i>Doenças cerebrovasculares e mediadores inflamatórios e de disfunção endotelial</i>	16
Objetivo.....	21
Referências Bibliográficas.....	22
Artigo em Inglês.....	33
- <i>Abstract</i>	34
- <i>Introduction</i>	35
- <i>Subjects and Methods</i>	37
- <i>Results</i>	40
- <i>Discussion</i>	42
- <i>References</i>	48
- <i>Tables</i>	54
- <i>Figures</i>	56
- <i>Figure Legends</i>	58
Artigo em Português.....	59
- <i>Resumo</i>	60
- <i>Introdução</i>	62

<i>-Materiais e Métodos</i>	65
<i>-Resultados</i>	68
<i>-Discussão</i>	70
<i>-Referências bibliográficas</i>	76
<i>-Tabelas</i>	82
<i>-Figuras</i>	84
<i>-Legendas das Figuras</i>	86
Anexo I - Termo de Consentimento.....	87
Anexo II - Protocolo para Coleta de Dados.....	90
Anexo III - Escala NIHSS.....	95
Anexo IV - Índice de Barthel.....	98

Introdução

A aterosclerose é atualmente reconhecida como uma doença com perfil inflamatório, em resposta a diferentes agressões ao endotélio vascular, que progride ao longo dos anos formando as placas ateroscleróticas. Eventos isquêmicos cardíacos e cerebrais desenvolvem-se de forma imprevisível em pacientes com graus variados de doença aterosclerótica. Marcadores inflamatórios como a Proteína C reativa podem prever o risco de eventos isquêmicos cardíacos e cerebrais. Aumento dos níveis de molécula intracelular de adesão (ICAM-1) está associado com aumento no risco de infarto agudo do miocárdio em homens saudáveis. Entretanto, não se encontrou correlação entre os aumentos dos níveis de molécula vascular de adesão (VCAM-1) e aumento do risco de eventos cardiovasculares.

Enquanto na doença cardiovascular os conceitos de inflamação e disfunção endotelial parecem estar bastante sedimentados, no âmbito da doença cerebrovascular estes aspectos só recentemente têm sido mais explorados. Considerando ainda o escasso e controverso aporte de informações a respeito do comportamento de mediadores que reflitam aspectos de biologia vascular durante a fase aguda dos eventos isquêmicos cerebrais, este estudo tem como objetivo determinar o perfil de liberação seqüencial de mediadores de disfunção endotelial (VCAM-1 e Endotelina-1) em pacientes apresentando síndromes cerebrovasculares agudas.

Revisão da literatura

Patogênese da aterosclerose – aspectos gerais

A aterosclerose foi considerada por muito tempo simplesmente uma doença causada por depósito de lipídios; atualmente entende-se ser esta uma doença inflamatória crônica da parede arterial em resposta a lesões repetitivas. Recentes avanços do conhecimento têm demonstrado o papel fundamental da inflamação como mediadora em todos os estágios desta doença, da iniciação com o recrutamento dos leucócitos à eventual ruptura de uma placa aterosclerótica instável levando a diferentes eventos aterotrombóticos^{1,2}. Assim, a aterosclerose pode ser vista como um processo imunológico envolvendo várias células atuando na parede vascular, incluindo linfócitos T, e produtos inflamatórios como citocinas e fatores de crescimento².

As lesões ateroscleróticas ocorrem principalmente nas artérias de grande e médio calibre, nas camadas elásticas e musculares, e podem levar à isquemia miocárdica, cerebral ou de extremidades, resultando em infarto. Estas lesões já podem estar presentes desde muito cedo na vida dos indivíduos. A lesão mais precoce, chamada estria gordurosa, que já é encontrada em lactentes e crianças, nada mais é do que uma lesão inflamatória, consistindo somente de monócitos derivados de macrófagos e linfócitos-T que englobam partículas de lipoproteína de baixa densidade (LDL) oxidada e que é encontrada na camada sub-endotelial dos vasos^{3,4}.

O modelo corrente da aterogênese é baseado na resposta à lesão, lesões estas causadas ao endotélio por distúrbios locais do fluxo sanguíneo em determinados pontos da rede arterial somado a fatores sistêmicos como a hipercolesterolemia, hiperglicemia, tabagismo e infecções que iniciam uma cascata de eventos levando por fim ao desenvolvimento da lesão aterosclerótica¹.

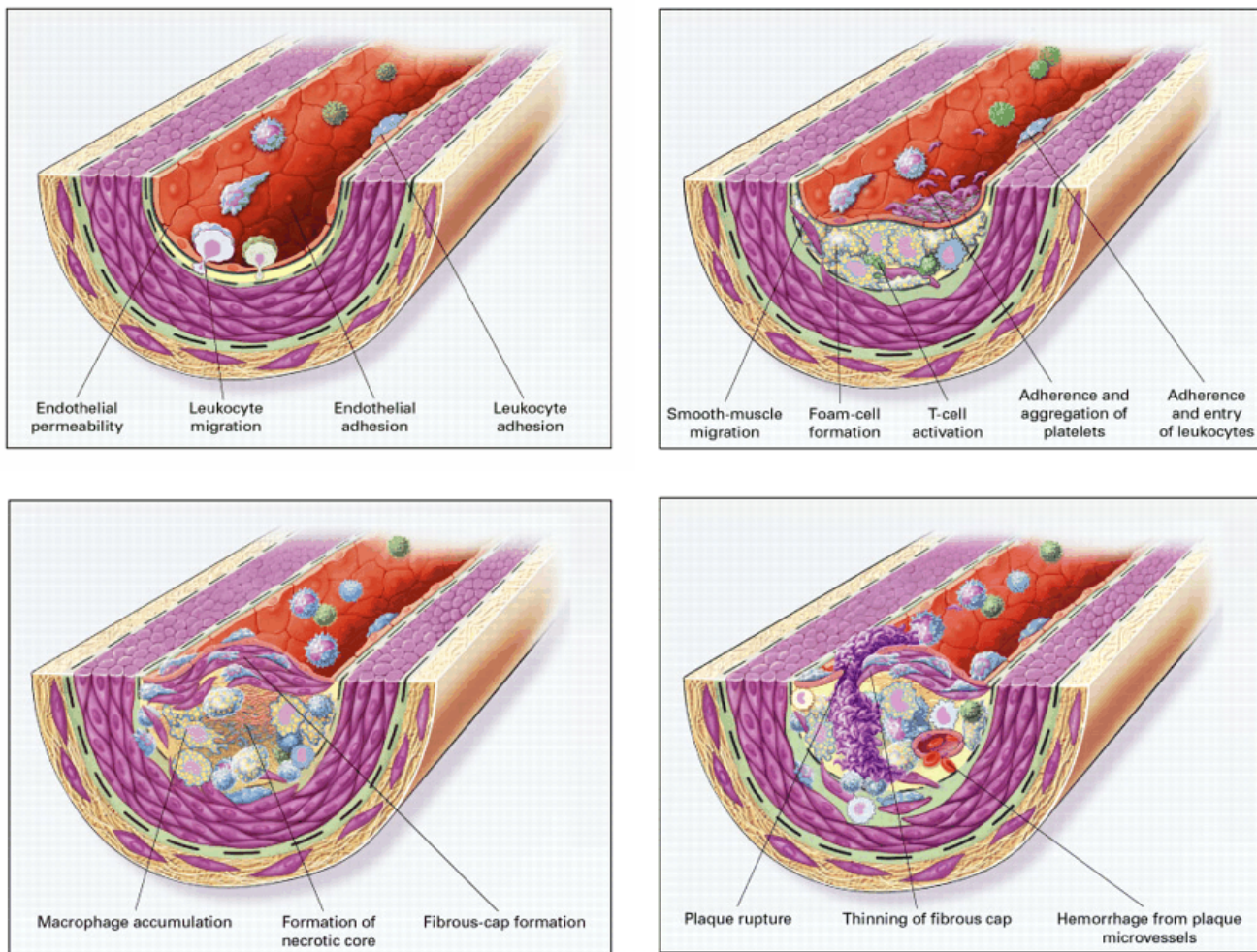


Figura 1. Seqüência de eventos que levam à formação da placa aterosclerótica segundo a hipótese de resposta a lesões repetitivas proposta por Russel Ross (adaptado de Russel Ross)¹.

O desenvolvimento inicial da lesão aterosclerótica envolve a aderência de monócitos e a subsequente transmigração através do endotélio vascular. A diferenciação de monócitos em macrófagos e o subsequente acúmulo de lipídios nestas células, células estas chamadas de células espumosas cujo aglomerado forma as chamadas estrias gordurosas. O recrutamento progressivo das células inflamatórias e a proliferação de células musculares levam a formação da placa aterosclerótica com uma

capa fibrosa separando o lago de lipídios pró-trombótico do fluxo sanguíneo luminal. Quando existe ruptura da fina capa fibrosa, ocorre o evento isquêmico aterotrombótico⁵. De fato, fatores que enfraquecem e causam a ruptura da capa fibrosa expõem o sangue a elementos pró-coagulantes presentes no núcleo lipídico, como por exemplo, o fator tecidual. A trombose e o subsequente remodelamento da placa instável pode ser catastrófico ou clinicamente silencioso dependendo do grau de oclusão vascular e da viabilidade da circulação colateral. Conforme a classificação de Stary e colaboradores, as lesões de I a IV geralmente são silenciosas, já as lesões tipos V e VI são obstrutivas e frequentemente são a base patológica das síndromes vasculares cardíológicas e cerebrais⁴.

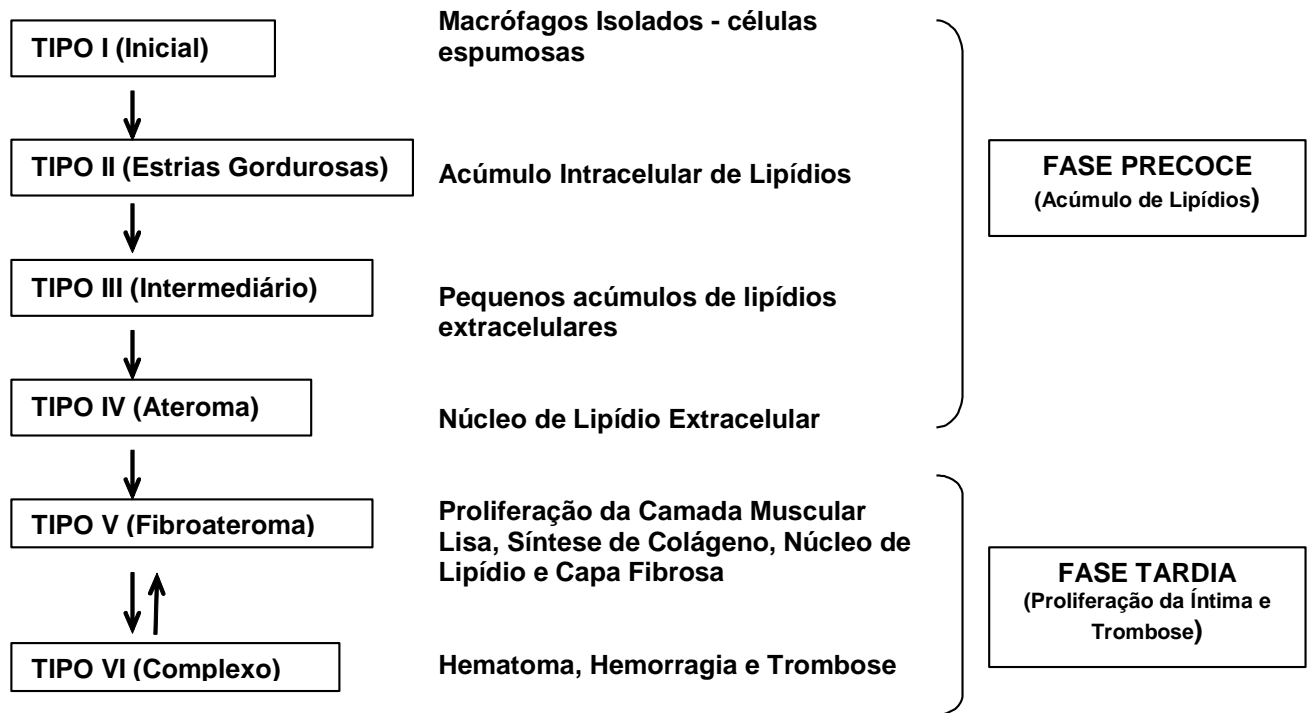


Figura 2. Evolução da lesão aterosclerótica: os estágios da aterosclerose estão divididos em duas fases: fase precoce, onde há o acúmulo de lipídios; fase tardia, com proliferação das células musculares lisas e trombose. As lesões nos estágios I-IV (tipos I-IV) não causam estenoses significativas. As lesões nos estágios V e particularmente VI (tipos V-VI) podem facilmente ser obstrutiva (adaptado de James K. Liao)⁷.

Disfunção endotelial

O conceito predominante atualmente de que a aterosclerose reflete uma resposta do endotélio a diversos tipos de lesão que, em última análise levam à formação de placas ateroscleróticas, trouxe à tona a importância do estudo e compreensão do endotélio vascular. De fato, é reconhecido hoje que esta lesão ao endotélio, causando disfunção endotelial, determina que este seja verdadeiramente o primeiro evento no processo aterosclerótico. Portanto, o conceito de disfunção endotelial é sinônimo de alteração precoce da doença aterosclerótica. Considerando a imensa gama de ações fisiológicas

do endotélio vascular, na sua maioria protetoras ao ambiente vascular, qualquer alteração nestas funções representa uma forma de disfunção endotelial. Por exemplo, perda da capacidade vasodilatadora, tendência pró-trombótica, tendência a aderir células inflamatórias, são todos elementos indicativos de que há perda de funções fisiológicas do endotélio, caracterizando o estado de disfunção endotelial, sem necessariamente haver lesão anatômica vascular detectável⁶.

O endotélio vascular é um órgão dinâmico que regula o tônus vascular, a homeostase local e o processo proliferativo fibro-inflamatório. Estas respostas são mediadas por várias substâncias liberadas pelo endotélio em resposta a estímulos fisiológicos, incluindo prostaciclina, endotelina e óxido nítrico⁶.

Quadro 1. Substâncias derivadas do endotélio (adaptado de James K. Liao)⁷.

Vasodilatores	Vasoconstritores
-Óxido Nítrico -Fator(es) Hiperpolarizante(s) -Prostaciclina	-Endotelina -Angiotensina II -Tromboxano A2
Moléculas de Adesão Celular	Citocinas
-VCAM-1 -ICAM -E-selectina	-Proteína quimiotática de monócitos -Interleucina-8
Fatores de Crescimento	Coagulantes/fibrinolíticos
-FC vascular endotelial -FC derivado de plaquetas -FC transformador -FC epidérmico ligado à heparina -M-CSF	-Fator de von Willebrand -Ativador plasminogênio -Fator inibidor do ativador de plasminogênio

VCAM: molécula vascular de adesão;
ICAM: molécula intracelular de adesão;
macrófagos

FC: fatores de crescimento;
M-CSF: fator estimulante de colônias de

Devido à sua localização entre a circulação e a parede vascular, o endotélio interage com mediadores celulares e hormonais destes dois compartimentos. A função endotelial do controle do tônus é normalmente determinada pelo diâmetro e contratilidade vascular, ou pelo fluxo sanguíneo em resposta a agonistas dependentes do endotélio como a acetilcolina ou a bradicinina. Mudanças no diâmetro dos vasos são detectadas por angiografia ou ultra-sonografia, e alterações no fluxo sanguíneo ou na resistência vascular são detectadas por pletismografia no antebraço ou na extremidade inferior⁷.

A disfunção endotelial pode ser definida como a diminuição na síntese, liberação e/ou atividade endotelial derivada do óxido nítrico (ON). A perda do ON contribui para a diminuição da capacidade de relaxamento vascular, aumento da agregação plaquetária, aumento da proliferação das células musculares lisas⁸ e aumento das moléculas de adesão expressas pelo endotélio. A disfunção endotelial também pode ser atribuída à liberação excessiva de substâncias vasoconstritoras como a endotelina (ET)-1⁷. Níveis circulantes elevados de ET-1 foram encontrados em pacientes com aterosclerose avançada e síndromes coronarianas agudas⁹. A exposição a fatores de risco como o LDL oxidado aumenta a produção e liberação de ET-1¹⁰. A elevação nos níveis de ET-1 associado a fatores de crescimento derivados de plaquetas promove a proliferação vascular de músculo liso nas lesões ateroscleróticas¹¹. Níveis circulantes de ET-1 configuram uma abordagem biológica para detecção de disfunção endotelial¹².

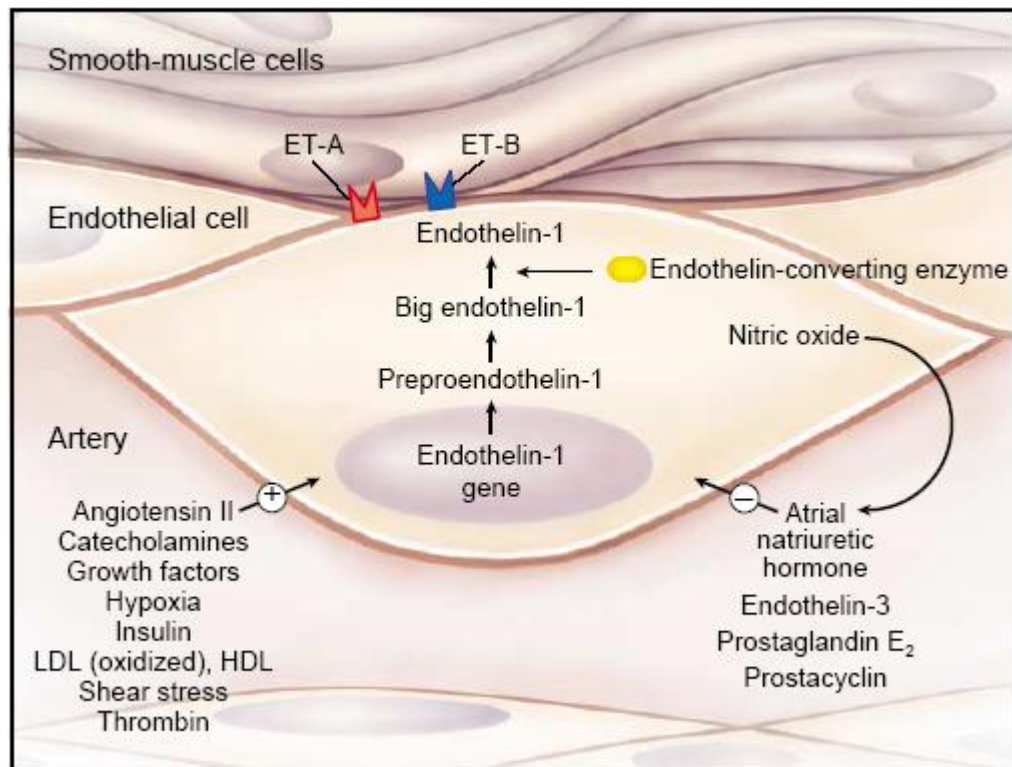


Figura 3. Regulação, processamento e secreção de proteínas relacionadas à ET-1 nas células endoteliais. A lista à esquerda na figura contém itens que estimulam a sua transcrição; à direita, itens que inibem a transcrição deste peptídeo (adaptado de Ellis R. Levin)¹³.

Outra forma de expressão de disfunção endotelial pode ser classificada como ativação endotelial. Normalmente, o endotélio vascular tem baixa adesividade para os leucócitos; entretanto quando estimulado (lesado, agredido) expressa moléculas de adesão na sua superfície, que serão responsáveis pela adesão e ativação dos leucócitos na superfície endotelial como uma pré-condição para a sua migração transendotelial^{14,15}. A ativação e a disfunção endotelial é um dos pontos críticos e mais importantes no estágio precoce da aterosclerose, pois é o passo que permite a entrada de células inflamatórias na camada íntima dos vasos¹⁶⁻¹⁸. Portanto, aspectos relacionados à inflamação estão intimamente relacionados à disfunção endotelial e

acompanham a patogênese da aterosclerose até o evento final com ruptura/fissura das placas levando aos eventos clinicamente aparentes.

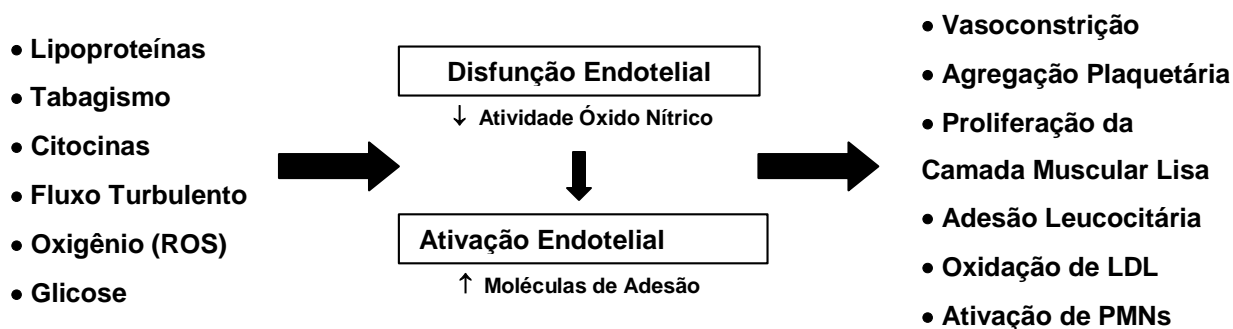


Figura 4. Fatores que levam à ativação e disfunção endotelial (adaptado de James K. Liao)⁷.

ROS: espécies reativas de oxigênio; PMNs: polimorfonucleares

Ativação endotelial e adesão de células inflamatórias – papel das moléculas de adesão

A ativação endotelial que leva à adesão das células inflamatórias promove a expressão de moléculas específicas na superfície endotelial que serão responsáveis por este contato. São as chamadas moléculas de adesão. Existem dois grandes grupos de moléculas de adesão, já descritos desde 1985:

- a família das seletinas cujos dois principais membros são a P-seletina e a E-seletina;
- a família supergene imunoglobulinas, onde os dois principais membros são a molécula intracelular de adesão (ICAM-1) e a molécula vascular de adesão (VCAM-1)¹⁹.

A P-seletina é o produto da ativação das plaquetas e células endoteliais e seus níveis estão aumentados em distúrbios trombóticos, diabetes melito e doenças isquêmicas cardiovasculares^{20,21}. O aumento nos níveis da E-seletina é o resultado da

ativação de células endoteliais²², e níveis aumentados desta molécula têm sido descritos em variantes da angina²³ e em doenças isquêmicas cardíacas²⁴.

A molécula ICAM-1 é produzida por células endoteliais, leucócitos, fibroblastos e células epiteliais²². Seus níveis estão aumentados em várias condições incluindo angina²³ e doenças arteriais coronarianas e periféricas²⁵. A molécula VCAM-1 é produzida somente pelas células endoteliais²⁶, seus níveis estão aumentados em múltiplas condições cardiovasculares^{23-25,27,28}.

Quando ocorre a ativação celular, após a adesão e transmigração das células inflamatórias, isoformas solúveis destas moléculas de adesão são liberadas na circulação após clivagem da superfície endotelial, podendo então ser quantificadas no sangue periférico. Visto que elas refletem a ativação de suas células de origem, a sua dosagem é considerada uma forma de obter informações sobre a inflamação do endotélio e a ativação da cascata de adesão *in vivo*. Níveis circulantes destas moléculas são considerados desfechos emprestados de disfunção endotelial^{19,29,30}.

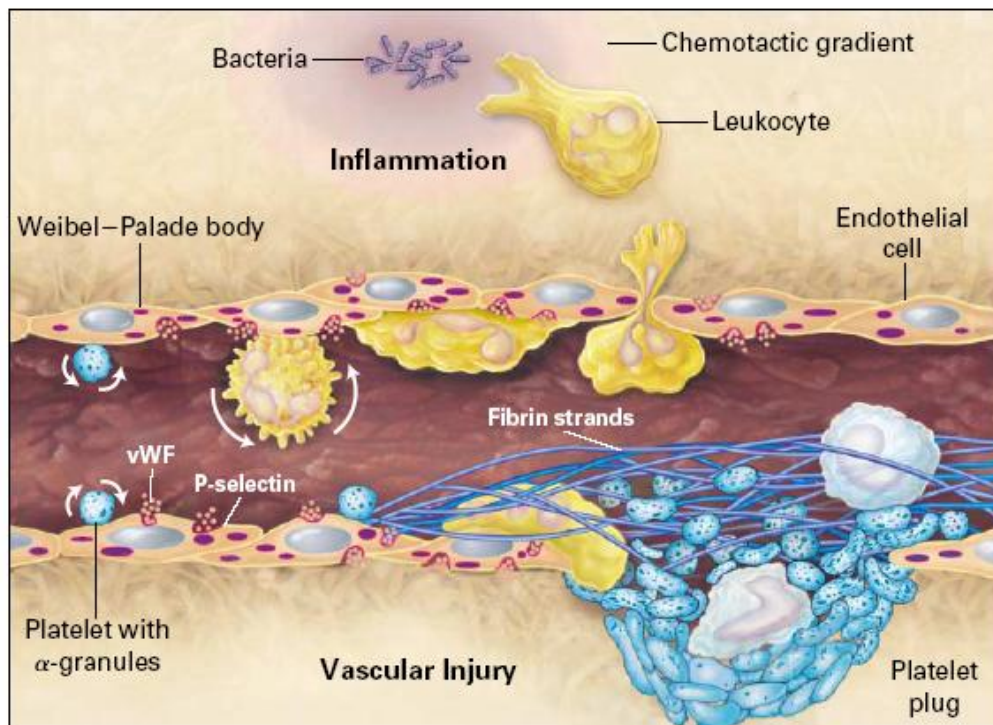


Figura 5. Interações entre as células sanguíneas e o vaso após este sofrer agressão ao seu endotélio – transmigração endotelial (adaptado de Paul S. Frenette)³¹.

Considerando a precocidade do aparecimento de disfunção endotelial em relação ao desenvolvimento de aterosclerose, vários autores têm proposto que os fatores de risco para a aterosclerose levam à disfunção do endotélio, seguido do desenvolvimento de lesões ateroscleróticas e conseqüentemente eventos isquêmicos aterotrombóticos, como síndrome coronariana aguda ou doenças cerebrovasculares. Este conceito estabelece importantes elos entre fatores de risco e mecanismos aterogênicos. Incluindo aspectos inflamatórios de maneira significativa ³¹. Abaixo alguns dos fatores de risco cardiovasculares mais conhecidos e sua relação com o surgimento de disfunção endotelial, precedendo a lesão aterosclerótica.

- a) Lipoproteínas oxidadas e inflamação: por quase um século os lipídios tem sido a condição *sine qua non* para a aterosclerose. Somente nas últimas décadas, um

modelo plausível ligando lipídios e inflamação tem surgido. De acordo com a hipótese da oxidação, a LDL retida na íntima, em parte por estar ligada a proteoglicano, sofre modificação oxidativa³². Estes lipídios modificados podem induzir a expressão de moléculas de adesão, citocinas pró-inflamatórias, e outros mediadores de inflamação em macrófagos e células da parede vascular. Estas partículas podem também modificar a parede vascular, ativando o sistema imunológico de células T³³. Em algumas situações experimentais, a administração de antioxidantes tem retardado a progressão das lesões ateroscleróticas que se desenvolvem na presença da hiperlipidemia. Embora atrativa, a relevância da hipótese da oxidação do LDL ainda não foi provada em humanos².

- b) Dislipidemia e inflamação: outras partículas lipoprotéicas como a lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) e a lipoproteína de densidade intermediária também têm considerável potencial aterogênico. Estas partículas podem sofrer modificação oxidativa assim como o LDL e ativar funções inflamatórias das células endoteliais da parede vascular. A lipoproteína de alta densidade (HDL) é um antioxidante, inibe a trombogênese e têm propriedades pró-fibrinolíticas. Além disso, protege contra a aterosclerose ao promover o transporte reverso do colesterol^{34,35}.
- c) Hipertensão arterial e inflamação: assim como na aterosclerose, a inflamação participa no processo fisiopatológico da hipertensão. A angiotensina II (AII), em adição a suas propriedades vasoconstritoras, pode desencadear inflamação intimal. Alguns dos benefícios da terapia com inibidores da enzima conversora da angiotensina podem derivar de suas ações antiinflamatórias¹².
- d) Diabetes e inflamação: a hiperglicemia associada a diabetes pode levar a modificações de macromoléculas que podem aumentar a produção de citocinas

- pró-inflamatórias e outras vias inflamatórias das células endoteliais vasculares. Além da hiperglicemia, o diabetes promove estresse oxidativo mediado por espécies reativas de oxigênio e grupos carbonil^{36,37}.
- e) Obesidade e inflamação: a obesidade não somente predispõe à resistência à insulina e a diabetes, mas contribui para a dislipidemia aterogênica. Altos níveis de ácidos graxos livres estimulam a síntese de triglicerídeos ricos em VLDL pelos hepatócitos. A elevação do VLDL pode diminuir o HDL, promovendo a inflamação e potencializando a aterogênese independente dos efeitos da resistência à insulina ou lipoproteínas³⁸.
- f) Infecção e inflamação: infecções agudas podem alterar os sistemas hemodinâmicos e fibrinolíticos precipitando eventos isquêmicos. Infecções crônicas podem aumentar a produção extravascular de citocinas inflamatórias que podem acelerar a evolução de lesões ateroscleróticas. Por exemplo, vários estudos têm demonstrado a presença *C. pneumoniae* em placas ateroscleróticas em humanos, porém sua relação causa-efeito ainda é debatida^{39,40}.

Mediadores Inflamatórios – Proteína C Reativa e Citocinas

A proteína C reativa (PCR) é um reagente de fase aguda que serve como uma molécula padrão no reconhecimento do sistema imune inato⁴¹. Tradicionalmente tem sido descrita como um marcador do processo de inflamação vascular sem ter um papel direto no processo inflamatório. Entretanto, evidências recentes sugerem que a PCR contribui diretamente no estado pró-inflamatório. A PCR estimula os monócitos a liberarem citocinas inflamatórias como interleucina (IL)-1 α , IL-6, e TNF- α ⁴². Também demonstrou-se que a PCR causa a expressão de ICAM-1 e VCAM-1 por células endoteliais⁴³ e promove a indução nas células endoteliais de monócito quimiotático de proteína (MCP)-1, um efeito que é inibido pela sinvastatina e pelo fenofibrato⁴⁴. A PCR

também tem sido encontrada no interior da placa aterosclerótica onde a mesma precede e promove o recrutamento de leucócitos. É um ativador do complemento, e o seu principal sítio de produção é hepático, entretanto já se sabe que o tecido arterial pode produzi-la. Isto fortalece o conceito de que a PCR é um ativador endógeno do complemento na placa aterosclerótica⁵.

Citocinas e os fatores de crescimento são produzidos por macrófagos, linfócitos T e células da parede vascular, principalmente as células da camada muscular lisa, regulando várias ações biológicas das células da parede vascular. Por exemplo, citocinas estimulam a síntese de colágeno nas células musculares lisas e promovem a ativação endotelial e de células musculares lisas através da indução das moléculas de adesão. Citocinas e fatores do crescimento promovem quimiotaxia de monócitos e adesão ao endotélio e sustentam a sua sobrevivência e diferenciação no interior dos macrófagos derivados das células espumosas⁷.

A presença de citocinas e mediadores inflamatórios na parede vascular têm levado a especulação de que a aterogênese pode ser resultado de processos infecciosos crônicos. Vários agentes infecciosos têm sido implicados no processo aterogênico, incluindo o vírus do herpes, citomegalovirus, e *C. pneumoniae*⁷. Por exemplo, imunohistoquímica e anticorpos para *C.pneumoniae* correlacionam-se com aumento da incidência de doença coronariana ⁴⁵. Entretanto, como as lesões ateroscleróticas demoram três a quatro décadas para desenvolverem-se, o agente causal pode não estar mais presente, ou seja, o agente infeccioso pode ser o fator inicial da disfunção endotelial, não estando mais presente no estágio tardio do desenvolvimento da placa⁷.

Determinação de disfunção endotelial e de atividade inflamatória associadas à doença cardiovascular

A elevação dos níveis plasmáticos de vários marcadores da cascata inflamatória tem sido associada a valor preditivo para risco futuro de ruptura de placa. Estes marcadores incluem P-seletina, IL-6, TNF- α , moléculas de adesão celular e PCR.

Aumento dos níveis de ICAM-1 está associado com aumento no risco de infarto agudo do miocárdio em homens saudáveis⁴⁶. Entretanto, não se encontrou correlação entre os aumentos dos níveis de VCAM-1 e aumento do risco de eventos cardiovasculares^{47,48}. Existem vários estudos demonstrando o valor preditivo da PCR para eventos secundários como a recorrência de eventos coronarianos e o seu valor prognóstico na fase aguda do infarto agudo do miocárdio cardíaco. Entretanto o mais importante uso atual da PCR é na prevenção primária, com a detecção de risco entre indivíduos saudáveis. Pessoas com níveis elevados de PCR tem 2-3 vezes maior risco do que pessoas com níveis baixos, inclusive nos pacientes com níveis de colesterol normais^{49,50}.

No contexto clínico de síndromes coronarianas agudas, trabalho realizado por Prado e colaboradores, estudou níveis circulantes da molécula de adesão VCAM-1 em pacientes submetidos a cineangiocoronagrafia por quadro de dor torácica. Observou-se que mesmo naqueles pacientes com coronárias consideradas angiograficamente normais, os níveis eram mais elevados do que naqueles pacientes com lesões significativas. Estes dados demonstram que parâmetros de disfunção endotelial (expressão e liberação de moléculas de adesão) podem estar presentes mesmo na ausência de lesões de coronárias significativas, uma vez que existam elementos considerados agressores ao endotélio como tabagismo, dislipidemia ou diabetes⁵¹. Finalmente, no contexto da associação de fatores de risco cardiovasculares (diabete melito e dislipidemia), mas sem evidência clínica de doença cardiovascular,

demonstrou-se elevação de marcadores de disfunção endotelial (ET-1 e fator de von Willebrand) comparativamente à presença de diabetes melito somente⁵². Estes dados sugerem que a resposta de disfunção endotelial seria tão mais evidente quanto maior for a magnitude de elementos causadores de lesão ao endotélio vascular.

Doenças cerebrovasculares e mediadores inflamatórios de disfunção endotelial

Moléculas de adesão

Enquanto na doença cardiovascular os conceitos de inflamação e disfunção endotelial parecem estar bastante sedimentados, no âmbito da doença cerebrovascular estes aspectos só recentemente têm sido mais explorados. Há um aumento de evidências de que os processos inflamatórios estejam envolvidos na isquemia cerebral aguda^{53,54}. Em modelos experimentais de acidente vascular cerebral (AVC), foi descrita a migração de leucócitos para o parênquima cerebral dentro de 12h após o evento isquêmico⁵⁵. Estudos experimentais em modelos de isquemia focal cerebral têm sugerido que os leucócitos polimorfonucleares causam um segundo processo lesional após o processo agudo isquêmico e a inibição deste processo diminuiria a extensão da lesão. Neste sentido, a leucocitose na fase aguda da isquemia cerebral tem sido associada com pior prognóstico em humanos⁵⁶. Além disto, também a reação inflamatória pode reduzir a chance de salvar a área de penumbra após a isquemia⁵⁷. Observações experimentais têm levado à hipótese de que a isquemia cerebral focal induz à ativação dos leucócitos e do endotélio cerebral mediado por TNF- α e IL-1^{58,59}. Também, na reperfusão os leucócitos podem aderir ao endotélio ativado e migrar para o tecido cerebral liberando mediadores pró-inflamatórios, o que causaria, como já mencionado, este segundo processo lesional com potencial dano neuronal para a área de penumbra isquêmica^{60,61}.

Não está claro o papel patogênico de cada molécula de adesão durante o evento isquêmico cerebral, o perfil de liberação destas moléculas, e se a extensão do infarto ou o grau de déficit neurológico correlacionam-se com os seus níveis. Também não estão definidas as diferenças entre acidente isquêmico transitório (AIT) e evento isquêmico completo com relação ao comportamento destas moléculas. Estudos experimentais demonstraram aumento da expressão destas moléculas nas áreas isquêmicas tanto nos eventos permanentes como transitórios de oclusão da artéria cerebral média^{62,63}. Em humanos, estudos com células endoteliais cerebrais também demonstraram aumento da expressão das mesmas em condições isquêmicas⁶⁴⁻⁶⁶. Existem vários estudos demonstrando a liberação destas moléculas na fase aguda do evento isquêmico, porém com resultados contraditórios. Em nove estudos foram mensurados os níveis plasmáticos dentro de 12 à 72h após o início dos sintomas neurológicos.⁶⁷⁻⁷⁵. Concentrações elevadas de ICAMs foram encontradas em 3 de 6 estudos⁶⁷⁻⁶⁹, de VCAMs em 3 de 4 estudos⁶⁸⁻⁷¹ e de E-selectina em 3 de 5 estudos^{68,69,71}. Possíveis explicações para estes resultados contraditórios estão nas diferenças dos grupos controle, método laboratorial usado e no tempo da coleta sanguínea. Também a presença de outras doenças como infecções, diabetes melito ou doenças sistêmicas podem ter influenciado nos resultados. Elevação nos níveis de VCAM e ICAM, mas níveis normais de E-seletina foram demonstrados em pacientes diabéticos, especialmente naqueles com infartos cerebrais silenciosos vistos por ressonância magnética cerebral^{26,76}.

Interessantemente, em experimentos em animais *knockout*, ausência das moléculas de adesão esteve associada a menor volume da área infartada após isquemia cerebral transitória focal⁷⁷. Neste sentido, o bloqueio da interação entre os leucócitos e o endotélio por agentes que mimetizassem ou inibissem estas moléculas de adesão poderia ser a base para uma nova estratégia terapêutica. Existem estudos

promissores em animais, mas ainda não efetivos em humanos^{78,79}. Em resumo, a liberação das moléculas de adesão parece ocorrer na isquemia cerebral, mas até o momento não está determinada a sua relevância clínica, pois não foi possível, em humanos, reduzir o tamanho da área infartada através do uso de anticorpos ou agentes que bloqueiem a liberação destas moléculas²⁶. Entretanto, a combinação destas estratégias e do uso da terapia trombolítica merece maior investigação, já que estes agentes são usados na fase hiperaguda com mecanismos de ação diferentes. Enquanto busca-se a reperfusão através de trombolíticos, o bloqueio da liberação de moléculas de adesão diminuiria a injúria pós-reperfusão²⁶.

Disfunção endotelial – Níveis de Endotelina-1

Vários estudos em AVC têm demonstrado elevação dos níveis de ET-1 em vários sub-tipos e fases do infarto cerebral⁸⁰⁻⁸⁴, mas resultados contraditórios também são encontrados⁸⁵⁻⁸⁸. Na grande maioria destes estudos, a elevação dos níveis de endotelina ocorreu na fase aguda, ou seja, nas primeiras 72h após o evento isquêmico com queda a partir do sétimo dia. Enquanto Ziv, Estrada e Alioglu^{81,82,84} encontraram aguda e marcada elevação dos níveis plasmáticos deste peptídeo e com tendência a valores maiores conforme o déficit do paciente; Haapaniemi descreve níveis plasmáticos normais em qualquer fase do AVC. Este foi um estudo prospectivo, observacional e longitudinal, onde a amostra foi composta por 101 pacientes consecutivos com mensuração de ET-1 na fase aguda, 1 semana, 1 mês e 3 meses após o evento agudo, não sendo demonstradas alterações nos níveis plasmáticos em qualquer um dos pontos de coleta, ou correlação com escalas neurológicas, fatores de risco ou novos eventos⁸⁵. Já Alioglu que descreveu níveis elevados na fase aguda do AVC, também não encontrou associação dos níveis plasmáticos com tamanho da área infartada, localização do infarto, déficit neurológico ou prognóstico⁸⁴. Por outro lado,

Lampl *et al.*⁸⁸ encontraram níveis de ET-1 mais elevados no líquido em pacientes com eventos cardioembólicos, e em pacientes com eventos aterotrombóticos de grandes vasos.

Assim, a relação entre os níveis plasmáticos de ET-1 e a patogênese do AVC, recorrência de eventos tromboembólicos e morte permanece incerta. A explicação pode dever-se ao fato de que vários destes estudos incluíram número reduzido de pacientes^{80,81,86,87}. Além disto, alguns não determinaram níveis plasmáticos na fase aguda dos eventos^{81,83,86} ou não realizaram o seguimento dos pacientes^{81,82,86,88}. Alguns estudos mensuraram os níveis de ET-1 no líquido^{80,87,88} e outros no plasma^{81-83,86,88}. Também os métodos de dosagem utilizados foram diferentes. Alguns investigadores utilizaram método de radioimunoensaio^{80-82,86,88} e outros de enzimaensaio^{83,87}. Todos estes fatores dificultam a interpretação e comparação dos resultados.

O papel das endotelinas na fisiologia cerebral não está claro, entretanto considerando sua intensa atividade vasoconstritora, poderia assumir-se que níveis elevados de ET-1 podem induzir dano tecidual isquêmico. Neste contexto, estudos experimentais apresentam modelos de isquemia cerebral em ratos com uso deste peptídeo⁸⁹. Por outro lado, alguns estudos sugerem mecanismos de neuroproteção com o uso de ET-1 exógena^{90,91}.

Proteína C Reativa

Estudo prospectivo com dados de uma coorte de grande comunidade (The Framingham Study) com homens e mulheres sem eventos prévios de isquemia cerebral ou AIT, demonstrou uma forte relação entre os níveis plasmáticos de PCR e a incidência de AVC ou AIT em ambos os sexos. Esta relação foi linear e consistente com a graduação dos quartis. Esta relação persiste após ajuste para viéses de confusão como tabagismo, hipertensão arterial, dislipidemia e diabetes. Assim, a elevação nos

níveis plasmáticos da PCR parece predizer o risco de isquemias cerebrais e AITs em idosos, sendo um marcador de prevenção primária⁹² Como a dosagem da PCR é simples e acessível, o uso deste marcador pode ajudar a identificar pessoas com maior risco de eventos isquêmicos cerebrais futuros, intensificando-se nestes pacientes os controles de fatores de risco e o uso de medicações como antiadesivos plaquetários, estatinas e anti-hipertensivos.

Objetivos

1. Objetivo Principal:

- Determinar o perfil de liberação seqüencial de mediadores de disfunção endotelial (VCAM-1 e ET-1) em pacientes apresentando síndromes cerebrovasculares agudas (AIT e AVC completo).

2. Objetivos Secundários:

- Comparar em três momentos seqüenciais (admissão, 7 dias e três meses) a elevação dos níveis plasmáticos de VCAM-1 e ET-1 em pacientes com AIT e AVC completo.

- Correlacionar os níveis de VCAM-1 e ET-1 com os déficits clínicos neurológicos.

Referências Bibliográficas

1. Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999;340:115-126.
2. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation.* 2002;105:1135-1143.
3. Napoli C, D'Armiento FP, Mancini FP, Postiglione A, Witztum JL, Palumbo G, Palinskiet W. Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia: intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. *J Clin Invest.* 1997;100:2680-90.
4. Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull Jr W, Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. 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.
5. Blake GJ, Ridker PM. Novel clinical markers of vascular wall inflammation. *Circulation.* 2001;89:763-771.
6. Egashira K. Clinical importance of endothelial function in arteriosclerosis and ischemic heart disease. *Circulation.* 2002;66:529-533.
7. Liao JK. Endothelium and acute syndromes. *Clin Chem.* 1998;44:1799-1808.
8. Garg UC, Hassid A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest.* 1989;83:1774-7.
9. Lerman A, Holmes Jr DR, Bell MR, Garratt KN, Nishimura RA, Burnett Jr JC. Endothelin in coronary endothelial dysfunction and early atherosclerosis in humans. *Circulation.* 1995;92:2426-31.

10. Martin-Nizard F, Houssaini HS, Lestavel-Delattre S, Duriez P, Fruchart JC. Modified low density lipoproteins activate human macrophages to secrete immunoreactive endothelin. *FEBS Lett.* 1991;293:127–30.
11. Weissberg PL, Witchell C, Davenport AP, Hesketh TR, Metcalfe JC. The endothelin peptides ET-1, ET-2, ET-3, and sarafotoxin S6b are co-mitogenic with platelet-derived growth factor for vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis.* 1990;85:257–62.
12. Kranzhofer R, Schmidt J, Pfeiffer CA, Hagl S, Libby P, Kübler W. Angiotensin induces inflammatory activation of human vascular smooth muscle cells. *Thromb Vasc Biol.* 1999;19:1623–1629.
13. Levin RE. Endothelins. *N Engl J Med.* 1995;333:356-363.
14. Bevilacqua MP, Stengelin S, Gimbrone Jr MA, Seed B. Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science.* 1989;243:1160-1165.
15. Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. *Nature.* 1990;34:425-434.
16. Alexander RW. Inflammation and coronary artery disease. *N Engl J Med.* 1994;331:468-469.
17. Harrison DG. Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J Clin Invest.* 1997;100:2153-2157.
18. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med.* 1993;329:2002-2012.
19. Gearing AJ, Newman W. Circulating adhesion molecules in disease. *Immunol Today.* 1993;14:506-512.
20. Blann AD, Lip GYH. Hypothesis: is soluble P-selectin a new marker of platelet activation. *Arteriosclerosis.* 1997;128:135-138.

21. Fijnheer R, Frijns CJM, Korteweg J, Rommes H, Peters JH, Sixma JJ, Nieuwenhuis HK. The origin of P-selectin as a circulating plasma protein GMP 140. *Science*. 1997;77:1081.
22. Pigott R, Dillon LP, Hemingway IH, Gearing AJ. Soluble forms of E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 are present in the supernatants of cytokine activated cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1992;187:584-589.
23. Miwa K, Igawa A, Inoue H. Soluble E-selectin, ICAM-1, and VCAM-1 in systemic and coronary circulation in patients with variant angina. *Cardiovasc Res*. 1997;36:37-44.
24. Blann AD, Amiral J, McCollum CN. Circulating endothelial cell leucocyte adhesion molecules in ischemic heart disease. *Br J Haematol*. 1996;95:263-265.
25. Blann AD, McCollum CN. Increased levels of soluble adhesion molecules in atherosclerosis. *Thromb Haemost*. 1994;72:151-154.
26. Frijns CJM, Kapelle LJ. Inflammatory cell adhesion molecules in ischemic cerebrovascular disease. *Stroke*. 2002;33:2115-2122.
27. Peter K, Nawroth P, Conradt C, Norbt T, Weiss T, Boehme M, Wunsch A, Allenberg J, Kubler W, Bode C. Circulating vascular cell adhesion molecule-1 correlates with the extent of human atherosclerosis in contrast to circulating ICAM-1, E-selectin, P-selectin and thrombomodulin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17:505-512.
28. DeCaterina R, Basta G, Lazzerini G, Dell'Omo G, Petrucci R, Morale M, Carmassi F, Pedrinelli R. Soluble vascular cell adhesion molecule-1 as a biohumoral correlate of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17:2646-2654.
29. Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood*. 1994;84:2068-2101.

30. Fassbender K, Bertsch T, Mielke O, Mühlhauser F, Hennerici M. Adhesion molecules in cerebrovascular diseases: evidence for an inflammatory endothelial activation in cerebral large and small vessel disease. *Stroke*. 1999;30:1647-1650.
31. Frenette PS, Wagner DD. Adhesion molecules - part II: blood vessels and blood cells. *N Engl J Med*. 1996;335:43-45.
32. Williams KJ, Tabas I. The response-to-retention hypothesis of atherogenesis reinforced. *Curr Opin Lipidol*. 1998;9:471-474.
33. Stemme S, Faber B, Holm J, al. e. T lymphocytes from human atherosclerotic plaques recognize oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:3893-3897.
34. Dichtl W, Nilsson L, Goncalves I, al. e. Very low-density lipoprotein activates nuclear factor- κ B in endothelial cells. *Circ Res*. 1999;84:1085-1094.
35. Spieker LE, Ruschitzka F, Luscher TF, Noll G. HDL and inflammation in atherosclerosis. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord*. 2004;4:51-57.
36. Schmidt AM, Yan SD, Wautier JL, Stem D. Activation of receptor for advanced glycation end products: a mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and atherosclerosis. *Circ Res*. 1999;84:489-497.
37. Baynes JW, Thorpe SR. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes Care*. 1999;48:1-9.
38. Yudkin JS, Stehouwer CD, Emeis JJ, al. e. C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19:972-978.

39. Libby P, Egan D, Skarlatos S. Roles of infectious agents in atherosclerosis and restenosis: an assessment of the evidence and need for future research. *Circulation*. 1997;96:4095–4103.
40. Kol A, Bourcier T, Lichtman AH, et al. Chlamydial and human heat shock protein 60s activate human vascular endothelium, smooth muscle cells, and macrophages. *J Clin Invest*. 1999;103:571–577.
41. Du Clos TW. Function of C-reactive protein. *Ann Med*. 2000;32:274–278.
42. Ballou SP, Lozanski G. Induction of inflammatory cytokine release from cultured human monocytes by C-reactive protein. *Cytokine*. 1992;4:361–368.
43. Pasceri V, Willerson JT, Yeh ET. Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. *Circulation*. 2000;102:2165–2168.
44. Pasceri V, Chang J, Willerson JT, Yeh ET. Modulation of c-reactive protein-mediated monocyte chemoattractant protein-1 induction in human endothelial cells by anti-atherosclerosis drugs. *Circulation*. 2001;103:2531–2534.
45. Kuo C, Campbell LA. Detection of *Chlamydia pneumoniae* in arterial tissues. *J Infect Dis*. 2000;181:S432-6.
46. Ridker PM, Hennekens CH, Roitman-Johnson B, Stampfer MJ, Allen J. Plasma concentration of soluble intercellular adhesion molecule 1 and risks of future myocardial infarction in apparently healthy men. *Lancet*. 1998;351:88–92.
47. Lemos JA, Hennekens C, Ridker PM. Plasma concentration of soluble vascular cell adhesion molecule-1 and subsequent cardiovascular risk. *J Am Coll Cardiol*. 2000;36:423-426.
48. Hwang SJ, Ballantyne CM, Sharrett AR, Smith LC, Davis CE, Gotto Jr AM, Boerwinkle E. Circulating adhesion molecules VCAM-1, ICAM-1, and E-selectin in carotid atherosclerosis and incident coronary heart disease cases: the

- Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) study. *Circulation*. 1997;96:4219–4225.
49. Ridker PM. High-sensitivity C-reactive protein: potential adjunct for global risk assessment in the primary prevention of cardiovascular disease. *Circulation*. 2001;103:1813-1818.
 50. Ridker PM. C-reactive protein. *Circulation*. 2003;108:81-85.
 51. Clausell N, Prado KF, Ribeiro JP. Increased plasma levels of soluble vascular cellular adhesion molecule-1 in patients with chest pain and angiographically normal coronary arteries. *Int J Cardiol*. 1999;68:275-280.
 52. Seligman BG, Biolo A, Polanczyk CA, Gross JG, Clausell N. Increased plasma levels of endothelin-1 and von Willebrand factor in patients with type 2 diabetes and dyslipidemia. *Diabetes Care*. 2000;23:1395-1400.
 53. Kim JS. Cytokines and adhesion molecules in stroke and related diseases. *J Neurol Sci*. 1996;137:69-78.
 54. Arvin B, Neville LF, Barone FC, Feuerstein GZ. The role of inflammation and cytokines in brain injury. *Neurosci Biobehav Rev*. 1996;20:445-452.
 55. Garcia JH, Liu KF, Yoshida Y, Lian J, Chen S, del Zoppo GZ. Influx of leukocytes and platelets in an evolving brain infarct (Wistar rat). *Am J Pathol*. 1994;144:188-199.
 56. Jean WC, Spellman SR, Nussbaum ES, Low WC. Reperfusion injury after focal cerebral ischemia: the role of inflammation and the therapeutic horizon. *Neurosurgery*. 1998;43:1382–1396.
 57. Kuroda S, Siesjo BK. Reperfusion damage following focal ischemia: pathophysiology and therapeutic windows. *Clin Neurosci*. 1997;4:199–212.
 58. Barone FC, Feuerstein GZ. Inflammatory mediators and stroke: new opportunities for novel therapeutics. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1999;9:819–834.

59. Clark WM. Cytokines and reperfusion injury. *Neurology*. 1997;49:S10–S14.
60. van Lookeren C, Thomas GR, Thibodeaux H, Palmer JT, Williams SP, Lowe DG, van Bruggen N. Secondary reduction in the apparent diffusion coefficient of water, increase in cerebral blood volume, and delayed neuronal death after middle cerebral artery occlusion and early reperfusion in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1999;19:1354–1364.
61. Zhang RL, Zhang ZG, Chopp M. Increased therapeutic efficacy with rt-PA and anti-CD18 antibody treatment of stroke in the rat. *Neurology*. 1999;52:273–279.
62. Okada Y, Copeland BR, Mori E, Tung MM, Thomas WS, del Zoppo GJ. P-selectin and intercellular adhesion molecule-1 expression after focal brain ischemia and reperfusion. *Stroke*. 1994;25:202–211.
63. Huang J, Choudhri TF, Winfree CJ, McTaggart RA, Kiss S, Mocco J, Kim LJ, Protopsaltis TS, Zhang Y, Pinsky DJ, Connolly Jr ES. Postischemic cerebrovascular E-selectin expression mediates tissue injury in murine stroke. *Stroke*. 2000;31:3047–3053.
64. Hess DC, Zhao W, Carroll J, McEachin M, Buchanan K. Increased expression of ICAM-1 during reoxygenation in brain endothelial cells. *Stroke*. 1994;25:1463–1467.
65. Stanimirovic DB, Wong J, Shapiro A, Durkin JP. Increase in surface expression of ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin in human cerebromicrovascular endothelial cells subjected to ischemia-like insults. *Acta Neurochir Suppl (Wien)*. 1997;70:12–16.
66. Howard EF, Chen Q, Cheng C, Carroll JE, Hess DC. NF-kappa B is activated and ICAM-1 gene expression is upregulated during reoxygenation of human brain endothelial cells. *Neurosci Lett*. 1998;248:199–203.

67. Shyu KG, Chang H, Lin CC. Serum levels of intercellular adhesion molecule-1 and E-selectin in patients with acute ischemic stroke. *J Neurol*. 1997;244:90–93.
68. Fassbender K, Mossner R, Motsch L, Kischka U, Grau A, Hennerici M. Circulating selectin- and immunoglobulin-type adhesion molecules in acute ischemic stroke. *Stroke*. 1995;1361-1364.
69. Bitsch A, Klene W, Murtada L, Prange H, Rieckmann P. A longitudinal prospective study of soluble adhesion molecules in acute stroke. *Stroke*. 1998;29:2129-2135.
70. Blann A, Kumar P, Krupinski J, McCollum C, Beevers DG, Lip GY. Soluble intercellular adhesion molecule-1, E-selectin, vascular cell adhesion molecule-1 and von Willebrand factor in stroke. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1999;10:277–284.
71. Frijns CJM, Kappelle LJ, van Gijn J, Nieuwenhuis HK, Sixma JJ, Fijnheer R. Soluble adhesion molecules reflect endothelial cell activation in ischemic stroke and in carotid atherosclerosis. *Stroke*. 1997;28:2214–2218.
72. Clark WM, Coull BM, Briley DP, Mainolfi E, Rothlein R. Circulating intercellular adhesion molecule-1 levels and neutrophil adhesion in stroke. *J Neuroimmunol*. 1993;44:123–125.
73. Wu G, Li F, Li P, Ruan C. Detection of plasma alpha-granule membrane protein GMP-140 using radiolabeled monoclonal antibodies in thrombotic diseases. *Haemostasis*. 1993;23:121–128.
74. Kim JS, Chopp M, Chen H, Levine SR, Carey JL, Welch KM. Adhesive glycoproteins CD11a and CD18 are upregulated in the leukocytes from patients with ischemic stroke and transient ischemic attacks. *J Neurol Sci*. 1995;128:45–50.
75. Fiszer U, Korczak-Kowalska G, Palasik W, Korlak J, Gorski A, Czlonkowska A. Increased expression of adhesion molecule CD18 (LFA-1beta) on the leukocytes

- of peripheral blood in patients with acute ischemic stroke. *Acta Neurol Scand.* 1998;97:221–224.
76. Kawamura T, Umemura T, Kanai A, Uno T, Matsumae H, Sano T, Sakamoto N, Sakakibara T, Nakamura J, Hotta N. The incidence and characteristics of silent cerebral infarction in elderly diabetic patients: association with serum-soluble adhesion molecules. *Diabetologia.* 1998;41:911–917.
77. Soriano SG, Coxon A, Wang YF, Frosch MP, Lipton SA, Hickey PR, Mayadas TN. Mice deficient in Mac-1 (CD11b/CD18) are less susceptible to cerebral ischemia/reperfusion injury. *Stroke.* 1999;30:134–139.
78. Hayward R, Campbell B, Shin YK, Scalia R, Lefer AM. Recombinant soluble P-selectin ligand-1 protects against myocardial ischemic reperfusion in cats. *Cardiovasc Res.* 1999;41:65–76.
79. Zhang RL, Chopp M, Jiang N, Tang WX, Probstak J, Manning AM, Anderson DC. Anti-intercellular adhesion molecule-1 antibody reduces ischemic cell damage after transient but not permanent middle cerebral artery occlusion in the Wistar rat. *Stroke.* 1995;26:1438–1443.
80. Hirata Y, Matsunaga T, Ando K, Furukawa T, Tsukagoshi HI, Maruma F. Presence of endothelin-1-like immunoreactivity in human cerebrospinal fluid. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990;166:1274–1278.
81. Ziv I, Fleminger G, Archiron A, Melamed E, Sokolovski M. Increased plasma endothelin-1 in acute ischemic stroke. *Stroke.* 1992;23:1014–1016.
82. Estrada V, Téllez MJ, Moya J, Fernández-Durango R, Egido J, Cruz AF. High plasma levels endothelin-1 and atrial natriuretic peptide in patients with acute ischemic stroke. *Am J Hypertens.* 1994;7:1085–1089.

83. Anwaar I, Gottsater A, Lindgarde F, Mattiasson I. Increasing plasma neopterin and persistent plasma endothelin during follow-up after acute cerebral ischemia. *Angiology*. 1999;50:1-8.
84. Alioglu Z, Orem A, Bulbul I, Boz C, Ozmenoglu M, Vanizor B. Evaluation of plasma endothelin-1 levels in patients with cerebral infarction. *Angiology*. 2002;53:77-82.
85. Haapaniemi E, Tatlisumak T, Hamel K, Soinne L, Lanni C, Opgenorth TJ, Kaste M. Plasma endothelin-1 neither increase nor correlated with neurological scores, stroke risk factors, or outcome in patients with ischemic stroke. *Stroke*. 2000;31:720-725.
86. Hamann GF, Isenberg E, Strittmatter E, Moili R, Schimrigk K. Big-endothelin in acute ischemic stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 1993;3:256-260.
87. Suzuki H, Sato S, Suzuki Y, Oka M, Tsuchiya T, Lino I, Yamanaka T, Ishihara N, Shimoda S. Endothelin immunoreactivity in CSF of patients with subarachnoid hemorrhage. *Ann Med*. 1990;22:233-236.
88. Lampl Y, Fleminger G, Gilad R, Galtron R, Sarova-Pinhas I, Sokolovski M. Endothelin in cerebrospinal fluid and plasma of patients in the early stage of ischemic stroke. *Stroke*. 1997;28:1951-1955.
89. Virley D, Hadingham SJ, Roberts JC, Farnfield B, Elliott H, Whelan G, Golder J, David C, Parsons AA, Hunter AJ. A new primate model of focal stroke: endothelin-1-induced middle cerebral artery occlusion and reperfusion in the common marmoset. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2004;24:24-41.
90. Narayanan U, Weiss HR, Liu X, Chi OZ. Exogenous endothelin-1 improves microvascular oxygen balance during focal cerebral ischemia in the rat. *Regulatory Peptides*. 2002;105:1-7.

91. Chi OZ, Liu X, Weiss HR. Effects of endothelin-1 on blood-brain barrier permeability during focal cerebral ischemia in rats. *Exp Brain Res*. 2001;141:1-5.
92. Rost NS, Wolf PA, Kase CS, Kelly-Hayes M, Silbershatz H, Massaro JM, D'Agostino RB, Franzblau C, Wilson PWF. Plasma concentration of C-reactive protein and risk of ischemic stroke and transient ischemic attack. The Framingham Study. *Stroke*. 2001;32:2575-2579.

**Levels of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 and Endothelin-1
Behave Differently in Transient Ischemic Attacks and Stroke:
a Longitudinal Prospective Study**

Rosane Brondani, Carlos R. M. Rieder, Denise Valente, Luis F. Araújo,

Nadine Clausell

Division of Neurology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre and Post-Graduate Program
in Medicine Science: Clinical Medicine

Federal University of Rio Grande do Sul, RS, Brazil

***Supported in part by grants from FIFE – Hospital de Clínicas de Porto Alegre,
CNPq and Post-Graduate Program in Clinical Medicine to Dr. Clausell***

Key words: inflammation, endothelial dysfunction, stroke

Address for correspondence:

Nadine Clausell, MD

Cardiovascular Division,

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos, 2350 – Room 2060

Porto Alegre, RS, Brazil - 90035 - 003

E-mail: clausell@portoweb.com.br

Abstract

Background: Inflammatory and endothelial dysfunction markers such as vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1 and endothelin (ET)-1 have been implicated in cerebrovascular syndromes but are poorly described regarding their temporal behavior according to stroke sub-types in humans.

Objectives: To determine levels of VCAM-1 and ET-1 in patients with acute cerebral ischemia (completed stroke and transient ischemic attack (TIA)) in three sequential moments.

Patients and Methods: Thirty-nine patients with a first episode (34 stroke and 5 TIA) were consecutively included in the study. Degree of functional impairment was evaluated by means of the modified National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS), and the Barthel-Index (BI). Blood samples to measure plasma levels of VCAM-1 and ET-1 by enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) were taken up to 72 hours of the acute event, at 7 and 90 days.

Results: In the whole group of patients, age was 63.6 ± 15.5 years; 54% male. Mean initial NIHSS score was 8 ± 7 ; at 3 months BI was 88 ± 26 . Although levels of both markers were already initially elevated globally, levels of ET-1 (pg/ml) were significantly higher in TIA patients compared to stroke patients, at all time-points (2.97 ± 0.66 ; 3.30 ± 1.37 ; 2.81 ± 0.82 versus 2.12 ± 0.77 ; 2.05 ± 1.03 ; 1.90 ± 0.68 at admission, 7 and 90 days, respectively, all $p = 0.02$). VCAM-1 levels were similar in both TIA and stroke patients.

Conclusions: Higher plasma levels of ET-1 in patients with TIA suggests different physiopathological mechanisms involving vascular endothelial cells in brain ischemia, according to different stroke subtypes.

Introduction

Inflammatory processes have increasingly been shown to be involved in the process of atherogenesis^{1,2}; in fact, the atherosclerotic process may be viewed as a highly specific cellular and molecular inflammatory response³⁻⁵, which has been thought to be also important in the pathogenesis of cerebrovascular diseases^{6,7}.

Following vascular injury, the expression of adhesion molecules in the surface of the vascular endothelium is considered an early and critical step related to atherothrombotic processes, allowing for inflammatory cells to adhere and transmigrate the vascular wall^{3,8}. It has been shown that following experimental cerebral ischemia, cerebral endothelial cells express adhesion molecules such as intercellular adhesion molecule (ICAM)-1, vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1 and E-selectin⁹. In fact, experimental studies have demonstrated massive leukocyte extravasation at sites of cerebral ischemia even within the first hours of the process^{10,11}; this could be mediated by adhesion molecules. Accordingly, experimental data indicate that blocking adhesion molecules activity, therefore diminishing the local inflammatory reaction, could be beneficial in the course of stroke¹².

Most adhesion molecules are not only expressed on cell surfaces but are also released into the circulation following subsequent shedding from the cell surface¹³. Measurement of circulating levels of these molecules may be viewed as biological assessment of atherogenesis, of endothelial dysfunction and/or inflammation which has been extensively studied in the context of coronary artery disease and cardiovascular risk factors¹⁴⁻¹⁷, but also in cerebrovascular disease^{6,7,18,19}. While prior studies in stroke patients have found elevated levels of different adhesion molecules, including VCAM-1^{7,18,20}, it remains poorly explored whether circulating levels of adhesion molecules have different profile comparing transient ischemic attack (TIA) and completed stroke.

Endothelin (ET)-1, a potent vasoconstrictor peptide, released by endothelial cells under a variety of pathogenic insults, is well recognized as a marker of severity in cardiovascular disease, indicating marked endothelial dysfunction²¹⁻²³. Endothelin-1 vasoconstrictor activity has been extensively investigated in experimental models of cerebral ischemia. Interestingly, both deleterious and neuroprotective actions have been postulated in this setting. In one hand, intense vasoconstriction ET-1-related has been shown to cause further cerebral tissue damage because of prolonged ischemia in rat models of cerebral infarct²⁴. Other investigators have shown that topical application of exogenous ET-1 to ischemic cortex led to reduced transfer coefficient of small hydrophilic molecules across the blood-brain barrier and promoted improved microvascular oxygen supply/consumption balance during focal cerebral ischemia²⁵. Despite several experimental studies on ET-1 and cerebral ischemia, reports regarding its profile and potential role in humans are limited. Little is known regarding ET-1 and different stroke types.

Thus, cellular and molecular mechanisms are likely involved in the pathogenesis of acute cerebrovascular syndromes, through inflammatory mediators and endothelial dysfunction markers, such as VCAM-1 and ET-1, respectively. Little is known of the longitudinal behavior of these molecules in the setting in stroke in humans, particularly regarding differences between TIA and completed stroke, which could have implications in the distinct pathogenetic mechanisms involved in either presentation. Therefore, in the present study we prospectively determined levels of VCAM-1 and ET-1 in patients with completed ischemic stroke and TIA sequentially within the first 3 months after the acute event.

Subjects and Methods

Study population

Thirty-nine consecutive patients with clinical symptoms of cerebral ischemia were included in the study at their admission to the Hospital de Clínicas de Porto Alegre and Hospital Mãe de Deus, Porto Alegre, RS, Brazil. The study included patients within 72 hours after onset of symptoms and only with a first ever ischemic stroke episode. Diagnosis was based on history, initial and follow-up neurological examinations and radiological examination using computed tomography (CT).

Cerebral ischemia was classified as follows: 1) neurological deficit with duration of ≤ 24 h was designated as TIA, 2) if deficits persisted for >24 h, the patient was classified as having a completed stroke. Stroke etiology was defined by Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment (TOAST) criteria: 1) cardioembolic, 2) large vessel disease, 3) small vessel disease, 4) undetermined causes²⁶. The affected vascular territory was defined on the basis of cranial CT scans. If neuroimaging did not show any recent vascular lesion, classification was based on clinical findings. Each patient underwent a diagnostic workup that included Doppler ultrasonic examination of cervical vessels, echocardiography, electrocardiography, and laboratory biochemical analysis which included screening for vasculitis and coagulopathies. Clinical examination and blood sampling (to measure VCAM-1 and ET-1 levels) were performed at study entry (up to 72h after onset symptoms - admission), 7 days and 3 months. At each time point, scores were assessed according to the National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS) (no disability = 0). The Barthel Index (BI)(no disability = 100) was performed at day seven and at three months. In TIA patients, when the first blood sample was collected, neurological symptoms had already disappeared. Risk factors for stroke were

elicited from the patient's history, physical examination, previous hospital records and laboratory analysis.

Exclusion criteria consisted of previous stroke, intracranial bleeding, presence of infections, other inflammatory or malignant disease, conditions associated with tissue injury (myocardial infarction or major surgical procedures) within the last year, or immunosuppressive treatment. Patients with radiological evidence of previous stroke were also excluded from the study.

The study was approved by the ethics committee of both institutions and was carried out according to the principles of the Declaration of Helsinki and the institutional guidelines. Informed consent was obtained from all patients before study entry.

Blood Sampling and Quantification of VCAM-1 and ET-1

Venous blood (15ml) was drawn to an ethylenediamine tetraacetic acid or citrate-containing tube. Samples were centrifuged and plasma was stored frozen at -70° C for subsequent blind analyses performed simultaneously for all samples. Prior to ET-1 measurement assay, extraction of ET-1 was performed using a centrifugal evaporator (Savant Instruments, Farmingdale, New York, NY, USA) after plasma-solvent dilution (40:5:1) of acetone, water and hydrochloric acid. Assays were carried out immediately after extraction. ET-1 and VCAM-1 were measured in duplicate samples by enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) (sensitivity < 2.0 ng/ml for VCAM-1; sensitivity < 1.0 pg/ml for ET-1).

Statistical analysis

Continuous variables are expressed as mean \pm standard error. Categorical variables are expressed as percentage. Statistical analyses were performed using SPSS for Windows, version 10 and SAS statistical software with the intention of: 1) to study VCAM-1 and ET-1 levels over time after stroke, and 2) to identify differences in VCAM-1

and ET-1 levels depending on stroke subtypes. For these purposes, two-way ANOVA for repeated measures was used to compare variables overtime in both types of stroke regarding differences within groups and between groups followed by post-hoc analysis using Student-Newman-Keuls test. Remaining comparisons between groups regarding continuous variables were performed using *t* test and chi-square for categorical variables, respectively. Significance was established at $p < 0.05$.

Results

Clinical and Neurological Characteristics of Patients

Of the 39 patients (age 62.6 ± 15.5 years), 21 were men and 18 were women. Thirty-four patients presented with completed stroke and 5 with TIA. Four events were categorized as cardioembolic, 31 as non-cardioembolic (atherothrombotic of large or small vessels) and four were of undetermined origin. In average, patients were included in the study within 35 ± 14 h of onset of symptoms. Hypertension, smoking and hypercholesterolemia were the most frequent cardiovascular risk factors found in the patients studied, similarly observed in both types of stroke. Up to three months, only one patient that had TIA died. Table 1 illustrates clinical demographics of patients.

At study entry, 20 patients were taking aspirin; patients with hypertension were receiving angiotensin-converting enzyme inhibitors, diuretics, beta-blockers and/or calcium channel blockers. Patients with diabetes were receiving sulphonylurea preparations and/or biguanides. No patient was receiving statins upon inclusion. In follow-up visits, to all patients statins were prescribed. Only five patients with completed stroke received oral anticoagulation. At discharge, with the exception of orally anticoagulated patients, all patients received aspirin or ticlopidine prescriptions. Overall, patients were treated according to established guidelines for the management of stroke²⁷.

Levels of VCAM-1

There was no significant difference in the levels of VCAM-1 at admission, 7 and 90 days after the ischemic event in the whole group of patients. Also, VCAM-1 levels did not show significant difference comparing patients with completed stroke and TIA in the

three moments analyzed, although a trend towards higher levels at three months was observed in patients with completed stroke compared to TIA patients ($p = 0.09$). Table 2. Figure 1. No correlation was found between VCAM-1 levels at all time points and severity of clinical symptoms evaluated by BI and NIHSS (values for r varied from -0.33 to 0.20 , $p > 0.05$).

Levels of Endothelin-1

Endothelin-1 levels did not show any significant variability overtime in group of patients as a whole. Table 2. However, ET-1 levels were different according to the type of cerebral ischemia. We have found that patients with TIA showed significant higher levels of ET-1 than patients with completed stroke, in all analyzed periods. Differences within each group overtime were not observed. Table 2. Figure 2. No significant correlation was observed between levels of ET-1 and BI and NIHSS (values for r varied from -0.25 to 0.16 , $p > 0.05$). At three months, in the whole group there was a trend towards higher ET-1 levels in patients with cardioembolic etiology ($p = 0.09$).

Discussion

Increasing evidence indicates that immunoinflammatory aspects and features of endothelial dysfunction may be similarly important in cerebrovascular events as already well established in cardiovascular atherothrombotic events^{6,7,28,29}. Several cellular and molecular events take place in these processes; however, little is known how specific players, such as adhesion molecules and ET-1 behave in the setting of cerebral ischemic episodes in humans. In this study, we sought to determine the pattern of circulating levels of VCAM-1 and of ET-1 in patients suffering a first acute cerebrovascular ischemic event in three sequential moments and compared whether there were differences related to subtypes of stroke, that is: TIA and completed stroke. We showed that overall, in the whole group of patients, levels of both markers did not change over time (admission, 7 and 90 days), but ET-1 levels were higher in patients presenting with TIA compared to patients with completed stroke.

Inflammatory aspects related to cerebral ischemia

Cerebral ischemia produces activation of endothelial cells that can lead to the expression of adhesion molecules such as VCAM-1, which can be released into the blood^{7,19}. In *in vitro* experimental models of cerebral ischemia, cerebral endothelial cells express high levels adhesion molecules⁹. In knockout mice lacking ICAM-1 gene, infarct volume was significantly reduced after transient middle cerebral artery occlusion compared with normal animals³⁰. However, in humans the evidence that inflammatory adhesion molecules are upregulated in patients with ischemic stroke is contradictory. Different studies have measured circulating VCAM-1 molecules in the peripheral blood of patients in samples taken within 12 to 72 hours after stroke onset^{18-20,31-36} showing contradictory results.

We have prospectively determined levels of VCAM-1 in patients with TIA and completed stroke within 3 months after onset of neurological symptoms to define their circulating pattern in the two clinical presentations. Although we did not determine control values, levels were elevated upon arrival at the hospital, according to studies from other investigators who measured VCAM-1 in normal control individuals (in average < 670 ng/ml) ^{19,37} and data from our own group that also demonstrated control values in average 734 ± 97 ng/ml¹⁴. The observed levels of VCAM-1 in our patients with acute cerebral ischemia, possibly indicates activation of the vascular endothelium in this setting. We could not find differences in values of this marker comparing admission, 7 and 90 days following the ischemic event, except for a trend towards higher levels at three months in patients with completed stroke. Thus, we could not define the precise moment in which increase in VCAM-1 levels begin in the course of stroke (our entry period was up to 72 h from onset of symptoms) nor at which point they finally reach control-like values, following resolution of the acute event. Finally, we could not find significant differences in VCAM-1 levels between patients with completed stroke and those with TIA, nor did others^{19,20}, except as mentioned above, by a trend towards higher levels at three months in patients with completed stroke. This latter finding could simply reflect a more evident total atherosclerotic inflammatory burden in patients with completed stroke, as others have already indicated³⁸, not necessarily related to the cerebrovascular event itself.

Levels of ET-1 in cerebral ischemia

Role of endothelins in brain physiology are unclear, however considering its intense vasoconstrictor activity, one might assume that increased levels of ET-1 could induce distal hypoxia (ischemic-tissue damage). In fact, taking together observations

regarding ET-1 in cerebral ischemia, higher levels are generally associated with more severe involvement³⁹⁻⁴¹. Accordingly, previous studies have shown that ET-1 levels are significantly higher in the cerebrospinal fluid of patients with large cortical infarctions than in patients with smaller subcortical lesions⁴¹. Ziv *et al.* reported that ET-1 plasma levels in stroke patients with more severe neurological impairment tended to be higher than those in patients with a milder disorder³⁹.

In this study, similarly to VCAM-1 levels, ET-1 levels did not change significantly over time in the whole group of patients but were initially elevated, compared to values obtained from control individuals in prior studies from our group^{42,43}. The significance of increased release of ET-1 during cerebral ischemia is not clear. It could be viewed either as a cause or consequence-event related to the vascular injury acute process or as others have indicated, merely reflecting atherosclerosis involvement⁴⁴. Furthermore, once ET-1 is upregulated in the setting of stroke, Kobari *et al.* suggest that dose-dependent ET-1 could exert dual effects on vasculature and on neurons: constrictive (low-dose) and vasodilatory (high-dose), through the induction of nitric oxide synthesis, probably by the endothelium⁴⁵.

When we analyzed ET-1 levels according to the type of cerebral ischemia we have found that patients with TIA showed significant higher levels of ET-1, in average 30-40% increase, than patients with stroke in the three moments of assessment. This observation suggests different physiopathological mechanisms involving endothelial cells in brain ischemia. Ischemic pre-conditioning mechanism has been recently demonstrated in cerebrovascular injury, whereby prior TIA episodes would favor less devastating stroke consequences in the future. The exact cellular and molecular mechanisms involved in this process are under investigation^{46,47}. Protective pathways related to flow-mediated mechanisms⁴⁸ could involve ET-1 vasoconstrictor actions.

Moreover, an attractive hypothesis for higher levels of ET-1 in TIA patients compared to patients with completed stroke, could link it to a yet another potential neuroprotective mechanism of ET-1 as postulated by Narayanan *et al.* In their experimental study, it was observed that exogenous ET-1 improves microvascular oxygen balance during focal cerebral ischemia because ET-1 caused a redistribution of available blood flow and possibly improved metabolism within the ischemic region. Thus, exogenous endothelin may vasoconstrict the relatively higher flow parts of the ischemic cortex, redistributing the blood flow within the ischemic area⁴⁹. Yet another possible beneficial effect of ET-1 in cerebral ischemia, refers to the fact that cerebral ischemia increases the transfer of small hydrophilic molecules. Topical application of ET-1 in the ischemic cortex attenuates the degree of increase in the transport of small hydrophilic molecules across the blood-brain barrier, sparing non ischemic regions²⁵.

Increased ET-1 levels in TIA patients may also represent a response to ischemia-reperfusion mechanism⁵⁰. It is well known that reperfusion occurs following dissolution of emboli⁵¹. Interestingly, we observed a trend towards higher ET-1 levels in patients with cardioembolic etiology (irrespective of stroke sub types), which is in accordance with findings by others⁴⁴. However, it has been described that anticoagulation may increase levels of ET-1; in our patients, all cases with cardioembolic etiology were anticoagulated. It could also be plausible that during TIA, the vascular wall reacts to injury by means of marked vasoconstriction, whereby ET-1 appears as major mediator. As to the relevance of this mechanism in humans, one could speculate that by limiting or abolishing formation of ischemic core (neuron death), as observed in TIA⁵², higher levels of ET-1 would be more likely associated with transient symptoms and less to permanent cerebral damage. However, while ours are descriptive data, experimental studies are needed to

address cause-effect mechanistic issues involving ET-1 in cerebral ischemia, comparing different stroke sub-types.

Study limitations

The absence of control values for the molecules of interest leaves a certain degree of uncertainty as how elevated levels in fact were. However, compared to several published data available dealing with the same commercially available ELISA kits, our values were well above normal-expected figures^{14,19,20,43,53}. Also, the time frame of assessments, up to three months, may not have been sufficient to allow levels to return to basal levels (lower than initial, admission levels). Therefore we cannot ascertain the time course of these molecules in cerebral ischemia in a three months period of observation. Finally the reduced number of patients presenting with TIA demands careful conclusions regarding differences observed in ET-1 levels in this group of patients. Nonetheless, differences were consistently observed in the three moments of assessments.

Conclusions

We have showed that in patients with after an acute cerebrovascular event, there is increase in VCAM-1 and ET-1 levels, indicating immunoinflammatory activity and endothelial dysfunction as part of the process. Moreover, while VCAM-1 levels were equally elevated in patients with complete stroke or with TIA, ET-1 levels were higher in patients with TIA. Pathogenesis of completed stroke and TIA bare some important differences that could account for the main finding of the present study. Completed stroke is mainly dependent of a ruptured atherothrombotic lesion with or without embolic phenomenon. TIA is mostly dependent of a focal vessel transient occlusion secondary to distal embolization⁵². Both VCAM-1 and ET-1 expression may signal these differences.

While these are descriptive, small-sample derived data, it suggests that vascular endothelium pathogenetic changes are not equally comparable in the development of different cerebrovascular syndromes. Further studies, both with larger number of patients as well as experimental models are necessary to explore in depth these newly made observations.

References

1. Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999;340:115-126.
2. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*. 2002;105:1135-1143.
3. Blake GJ, Ridker PM. Novel clinical markers of vascular wall inflammation. *Circulation*. 2001;89:763-771.
4. Ridker PM. On evolutionary biology, inflammation, infection, and the causes of atherosclerosis. *Circulation*. 2002;105:2-4.
5. Harrison DG. Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J Clin Invest*. 1997;100:2153-2157.
6. Frijns CJM, Kapelle LJ. Inflammatory cell adhesion molecules in ischemic cerebrovascular disease. *Stroke*. 2002;33:2115-2122.
7. Fassbender K, Bertsch T, Mielke O, Mühlhauser F, Hennerici M. Adhesion molecules in cerebrovascular diseases: evidence for an inflammatory endothelial activation in cerebral large and small vessel disease. *Stroke*. 1999;30:1647-1650.
8. Fries J, Williams A, Atkins R, Newman W, Lipscomb M, Collins T. Expression of VCAM-1 and E-selectin in an in vivo model of endothelial activation. *Am J Pathol*. 1993;143:725-37.
9. Stanimirovic DB, Wong J, Shapiro A, Durkin JP. Increase in surface expression of ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin in human cerebromicrovascular endothelial cells subjected to ischemia-like insults. *Acta Neurochir Suppl (Wien)*. 1997;70:12-16.

10. del Zoppo GJ, Schmid-Schonbein GW, Mori E, Copeland BR, Chang C-M. Polymorphonuclear leukocytes occlude capillaries following middle cerebral artery occlusion and reperfusion in baboons. *Stroke*. 1991;22:1276-1283.
11. Matsuo Y, Onodera H, Shiga Y, Nakamura M, Ninomiya M, Kihara T, Kogure K. Correlation between myeloperoxidase-quantified neutrophil accumulation and ischemic brain injury in the rat: effects of neutrophil depletion. *Stroke*. 1994;25:1469–1475.
12. DeGraba TJ. The role of inflammation after acute stroke: utility of pursuing anti-adhesion molecule therapy. *Neurology*. 1998;51:S62-8.
13. Gearing AJ, Newman W. Circulating adhesion molecules in disease. *Immunol Today*. 1993;14:506-512.
14. Clausell N, Prado KF, Ribeiro JP. Increased plasma levels of soluble vascular cellular adhesion molecule-1 in patients with chest pain and angiographically normal coronary arteries. *Int J Cardiol*. 1999;68:275-280.
15. Ridker PM, Hennekens CH, Roitman-Johnson B, Stampfer MJ, Allen J. Plasma concentration of soluble intercellular adhesion molecule 1 and risks of future myocardial infarction in apparently healthy men. *Lancet*. 1998;351:88–92.
16. Blann AD, Amiral J, McCollum CN. Circulating endothelial cell leukocyte adhesion molecules in ischemic heart disease. *Br J Haematol*. 1996;95:263-265.
17. Egashira K. Clinical importance of endothelial function in arteriosclerosis and ischemic heart disease. *Circulation*. 2002;66:529-533.
18. Fassbender K, Mossner R, Motsch L, Kischka U, Grau A, Hennrich M. Circulating selectin- and immunoglobulin-type adhesion molecules in acute ischemic stroke. *Stroke*. 1995:1361-1364.

19. Frijns CJM, Kappelle LJ, van Gijn J, Nieuwenhuis HK, Sixma JJ, Fijnheer R. Soluble adhesion molecules reflect endothelial cell activation in ischemic stroke and in carotid atherosclerosis. *Stroke*. 1997;28:2214–2218.
20. Bitsch A, Klene W, Murtada L, Prange H, Rieckmann P. A longitudinal prospective study of soluble adhesion molecules in acute stroke. *Stroke*. 1998;29:2129-2135.
21. Levin RE. Endothelins. *N Engl J Med*. 1995;333:356-363.
22. Masaki T. Historical review: endothelin. *Trends Pharmacol Sci*. 2004;25:219-224.
23. Liao JK. Endothelium and acute syndromes. *Clin Chem*. 1998;44:1799-1808.
24. Barone FC, Willette RN, Yue T-L, Feuerstein G. Therapeutic effects of endothelin receptor antagonists in stroke. *Neurol Res*. 1995;17:259-264.
25. Chi OZ, Liu X, Weiss HR. Effects of endothelin-1 on blood-brain barrier permeability during focal cerebral ischemia in rats. *Exp Brain Res*. 2001;141:1-5.
26. Adams Jr HP, Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, Marsh EEI. Classification of subtype of acute ischemic stroke. *Stroke*. 1993;24:35-41.
27. Adams Jr HP, Adams RJ, Brott T, del Zoppo GJ, Furlan A, Goldstein LB, Grubb RL, Higashida R, Kidwell C, Kwiatkowski TG, Marler JR, Hademenos GJ. Guidelines for the early management of patients with ischemic stroke: a scientific statement from the stroke council of the American Stroke Association. *Stroke*. 2003;34:1056-1083.
28. Blann AD, Path MRC, Ridker PM, Lip GYH. Inflammation, cell adhesion molecules, and stroke: tool in pathophysiology and epidemiology? *Stroke*. 2002;33:2141-2143.
29. Kozuka K, Kohriyama T, Nomura E, Ikeda J, Kajikawa H, Nakamura S. Endothelial markers and adhesion molecules in acute ischemic stroke--

- sequential change and differences in stroke subtype. *Atherosclerosis*. 2002;161:161-168.
30. Soriano SG, Coxon A, Wang YF, Frosch MP, Lipton SA, Hickey PR, Mayadas TN. Mice deficient in Mac-1 (CD11b/CD18) are less susceptible to cerebral ischemia/reperfusion injury. *Stroke*. 1999;30:134–139.
 31. Shyu KG, Chang H, Lin CC. Serum levels of intercellular adhesion molecule-1 and E-selectin in patients with acute ischemic stroke. *J Neurol*. 1997;244:90–93.
 32. Blann A, Kumar P, Krupinski J, McCollum C, Beevers DG, Lip GY. Soluble intercellular adhesion molecule-1, E-selectin, vascular cell adhesion molecule-1 and von Willebrand factor in stroke. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1999;10:277–284.
 33. Clark WM, Coull BM, Briley DP, Mainolfi E, Rothlein R. Circulating intercellular adhesion molecule-1 levels and neutrophil adhesion in stroke. *J Neuroimmunol*. 1993;44:123–125.
 34. Wu G, Li F, Li P, Ruan C. Detection of plasma alpha-granule membrane protein GMP-140 using radiolabeled monoclonal antibodies in thrombotic diseases. *Haemostasis*. 1993;23:121–128.
 35. Kim JS. Cytokines and adhesion molecules in stroke and related diseases. *J Neurol Sci*. 1996;137:69-78.
 36. Fiszer U, Korczak-Kowalska G, Palasik W, Korlak J, Gorski A, Czlonkowska A. Increased expression of adhesion molecule CD18 (LFA-1beta) on the leukocytes of peripheral blood in patients with acute ischemic stroke. *Acta Neurol Scand*. 1998;97:221–224.
 37. Lemos JA, Hennekens C, Ridker PM. Plasma concentration of soluble vascular cell adhesion molecule-1 and subsequent cardiovascular risk. *J Am Coll Cardiol*. 2000;36:423-426.

38. Abliz H, Meinders A. C-reactive protein: history and revival. *Eur J Intern Med.* 2002;13:412.
39. Ziv I, Fleminger G, Archiron A, Melamed E, Sokolovski M. Increased plasma endothelin-1 in acute ischemic stroke. *Stroke.* 1992;23:1014-1016.
40. Estrada V, Téllez MJ, Moya J, Fernández-Durango R, Egido J, Cruz AF. High plasma levels endothelin-1 and atrial natriuretic peptide in patients with acute ischemic stroke. *Am J Hypertens.* 1994;7:1085-1089.
41. Lampl Y, Fleminger G, Gilad R, Galtron R, Sarova-Pinhas I, Sokolovski M. Endothelin in cerebrospinal fluid and plasma of patients in the early stage of ischemic stroke. *Stroke.* 1997;28:1951-1955.
42. Brauner JS, Rohde LE, Clausell N. Circulating endothelin-1 and tumor necrosis factor-alpha: early predictors of mortality in patients with septic shock. *Intensive Care Med.* 2000;26:305-13.
43. Seligman BG, Biolo A, Polanczyk CA, Gross JG, Clausell N. Increased plasma levels of endothelin-1 and von Willebrand factor in patients with type 2 diabetes and dyslipidemia. *Diabetes Care.* 2000;23:1395-1400.
44. Anwaar I, Gottsater A, Lindgarde F, Mattiasson I. Increasing plasma neopterin and persistent plasma endothelin during follow-up after acute cerebral ischemia. *Angiology.* 1999;50:1-8.
45. Kobari M, Fukuuchi Y, Tomita M, Tanahashi N, Konno S, Takeda H. Cerebral vasodilatory effect of high-dose intravascular endothelin-1: inhibition by NG-monomethyl-L-arginine. *J Auton Nerv Syst.* 1994;49:111-115.
46. Wegener S, Gottschalk B, Jovanovic V, Knab R, Fiebach JB, Schellinger PD, Kucinski T, Jungehülsing GJ, Brunecker P, Muller B, Banasik A, Amberger N, Wernecke KD, Siebler M, Röther J, Villringer A, Weih M. Transient ischemic

- attacks before ischemic stroke: preconditioning the human brain? A Multicenter Magnetic Resonance Imaging Study. *Stroke*. 2004;35:616-621.
47. Weih M, Kallenberg K, Bergk A, Dirnagl U, Harms L, Wernecke KD, Einhüpl KM. Attenuated stroke severity after prodromal TIA: a role for ischemic tolerance in the brain? *Stroke*. 1999;1999:1851–1854.
 48. Stagliano NE, Perez-Pinzon MA, Moskowitz MA, Huang PL. Focal ischemic preconditioning induces rapid tolerance to middle cerebral artery occlusion in mice. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1999;19:757–761.
 49. Narayanan U, Weiss HR, Liu X, Chi OZ. Exogenous endothelin-1 improves microvascular oxygen balance during focal cerebral ischemia in the rat. *Regulatory Peptides*. 2002;105:1-7.
 50. Matsuo Y, Mihara S, Ninomiya M, Fujimoto M. Protective effect of endothelin type A receptor antagonist on brain edema and injury after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke*. 2001;32:2143-8.
 51. Schaller B, Graf R. Cerebral ischemia and reperfusion: the pathophysiologic concept as a basis for clinical therapy. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2004;24:351-71.
 52. Caplan LR. Basic pathology, anatomy, and pathophysiology of stroke. In: Caplan LR, ed. *Caplan's Stroke: A Clinical Approach*. Third ed. Boston: Butterworth Heinemann; 2000:17-50.
 53. Haapaniemi E, Tatlisumak T, Hamel K, Soenne L, Lanni C, Opgenorth TJ, Kaste M. Plasma endothelin-1 neither increase nor correlated with neurological scores, stroke risk factors, or outcome in patients with ischemic stroke. *Stroke*. 2000;31:720-725.

Table 1. Clinical Data of the Study Population (n = 39)

	Completed Stroke	TIA	p
n	34	5	
Age (years)	64 ±13	53 ± 23	0,42
Sex (M/F)	18/16	3/2	0.57
Hypertension, n (%)	29 (85)	3 (60)	0.21
Current Smoking, n (%)	18 (52)	3 (60)	0.58
Hypercholesterolemia, n (%)	16 (47)	2 (40)	0.57
Family History, n (%)	6 (17)	1 (20)	0.65
Diabetes Mellitus, n (%)	13 (38)	1 (20)	0.4
Previous Cardiac Disease			
-Atrial Fibrillation, n (%)	3 (9)	0	0.65
-Coronary Artery Disease, n (%)	2 (6)	0	0.76
Oral Contraceptives, n(%)	1 (3)	0	0.87
Migraine, n (%)	2 (6)	0	0.76
NIHSS (admission)	9 ± 7	0	-
NIHSS (7 days)	8 ± 7	0	-
NIHSS (3 months)	5 ± 6	0	-
Barthel Index (7 days)	55 ± 37	100	-
Barthel Index (3 months)	87 ± 27	100	-
TOAST			-
-Cardioembolic, n (%)	3 (9)	1 (20)	-
-Large vessel disease, n (%)	14 (41)	1 (20)	-
-Small vessel disease, n (%)	16 (47)	0	-
-Indeterminate, n (%)	1 (3)	3 (60)	-

Continuous variables are expressed as mean ± SD

Table 2. Levels of ET-1 and VCAM-1 in the three moments analyzed

	All (n = 39)	Completed Stroke (n = 34)	TIA (n = 5)	p*
VCAM-1 (admission)	758 ± 240	772 ± 241	662 ± 240	0.34
VCAM-1 (7days)	857 ± 317	865 ± 299	809 ± 457	0.72
VCAM-1(3 months)	853 ± 338	892 ± 334	582 ± 241	0.09
p**	0.60	0.34	0.78	
ET-1 (admission)	2.23 ± 0.80	2.12 ± 0.77	2.97 ± 0.66	0.02
ET-1 (7 days)	2.22 ± 1.14	2.05 ± 1.03	3.30 ± 1.37	0.02
ET-1 (3 months)	2.02 ± 0.75	1.90 ± 0.68	2.81 ± 0.82	0.02
p**	0.37	0.86	0.61	

Values are mean ± SD; ET-1 expressed in pg/ml; VCAM-1 expressed in ng/ml

p* indicates differences comparing completed stroke and TIA

p** indicates comparison along the time points for each marker

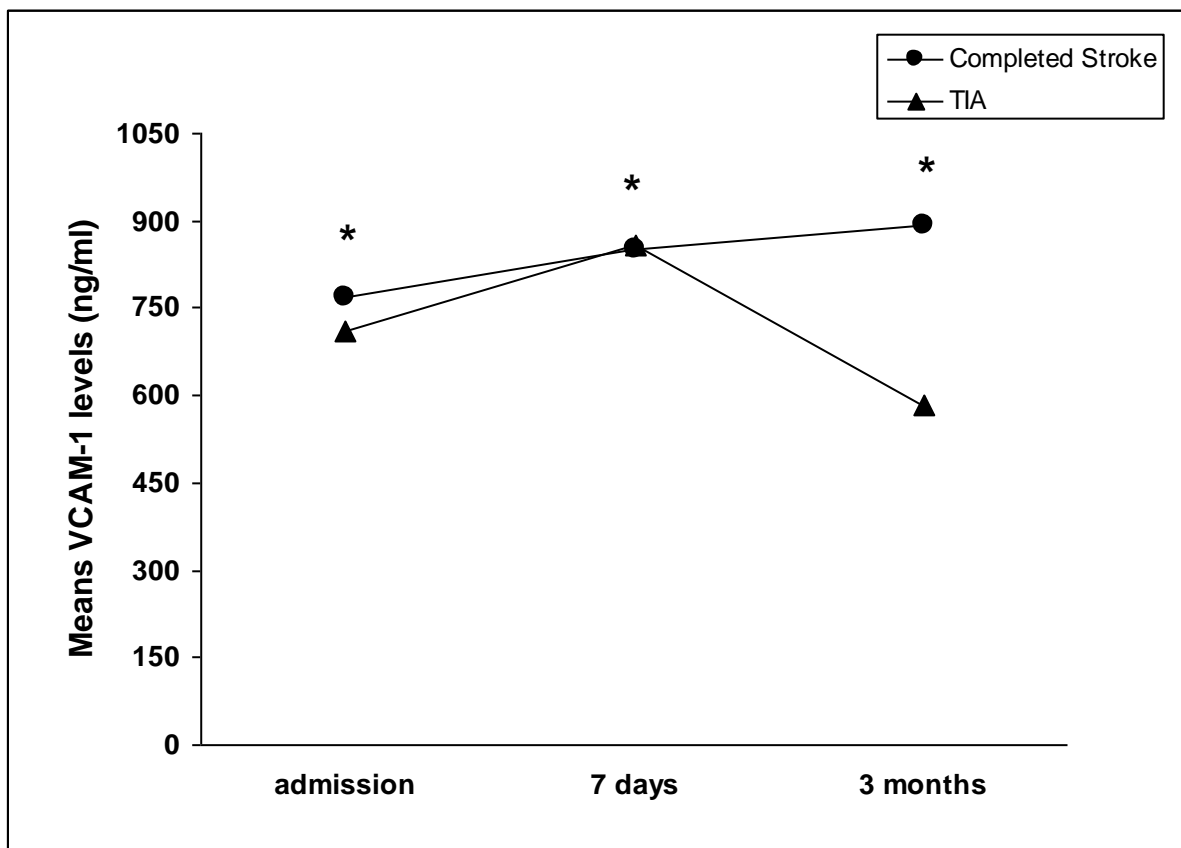


Figure 1.

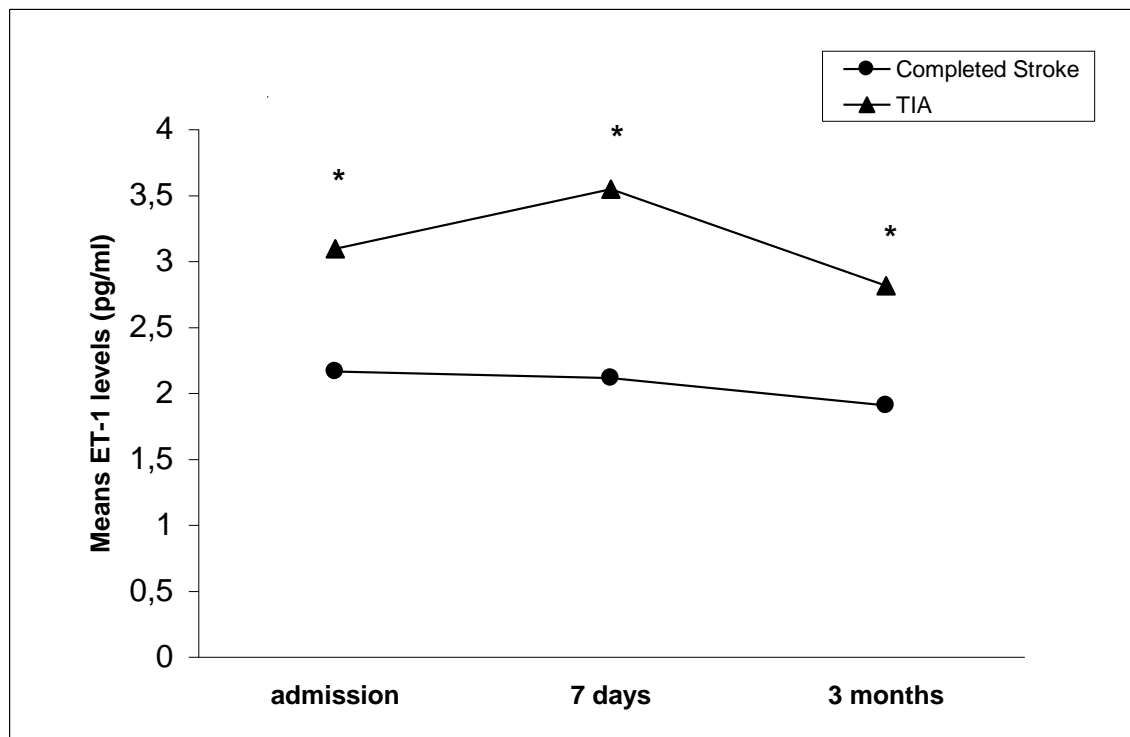


Figure 2.

Figure 1. VCAM-1 levels in completed stroke and in TIA in all time points. Two way ANOVA for repeated measures: no statistically significant differences were observed within each group or between groups overtime. No interaction between time and groups was observed. * p value > 0.05 for comparison between groups in all time points. Note: at each time point, only available complete data for each patient were analyzed.

Figure 2. Endothelin-1 levels in completed stroke and in TIA in all time points. Two way ANOVA for repeated measures: endothelin-1 levels in TIA patients were significantly higher than in patients with completed stroke in all time points. No differences were observed within each group overtime and there was no interaction between time and groups. * p value = 0.01 for comparison between groups. Note: at each time point, only available complete data for each patient were analyzed.

Níveis de Molécula de Adesão Vascular-1 e Endotelina-1 Apresentam Perfis Diferenciados em Acidente Isquêmico Transitório e Acidente Vascular Cerebral Isquêmico: um Estudo Prospectivo Longitudinal

*Rosane Brondani, Carlos R. M. Rieder, Denise Valente, Luis Felipe L. Araújo,
Nadine Clausell*

Divisão de Neurologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre e Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Clínica Médica
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, Brasil

Financiado pelo FIFE – Hospital de Clínicas de Porto Alegre, CNPq e Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Clínica Médica para Dra. Nadine Clausell

Palavras chave: inflamação, disfunção endotelial, acidente vascular cerebral

Endereço para correspondência:

Dra. Nadine Clausell

Serviço de Cardiologia

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos, 2350 – Sala 2060

Porto Alegre, RS, Brasil - 90035 - 003

E-mail: clausell@portoweb.com.br

Resumo

Introdução: Marcadores inflamatórios e de disfunção endotelial como a molécula de adesão vascular (VCAM)-1 e a endotelina (ET)-1 têm sido implicados em síndromes cerebrovasculares, mas são pobremente descritos considerando seu comportamento temporal de acordo com os subtipos de doença cerebrovascular em humanos.

Objetivos: Determinar os níveis de VCAM-1 e ET-1 em pacientes com AVC isquêmico agudo (AVC completo e acidente isquêmico transitório (AIT)) em três momentos seqüenciais.

Pacientes e Métodos: Trinta e nove pacientes com primeiro evento isquêmico (34 com AVC completo e 5 com AIT) foram incluídos de forma consecutiva neste estudo. A gravidade dos déficits funcionais foi avaliada através do *National Institutes of Health Stroke Scale* (NIHSS) e o Índice de Barthel (IB). Amostras de sangue para a mensuração plasmática dos níveis de VCAM-1 e ET-1 através do método de enzima-imunoensaio (ELISA), foram coletadas até 72h do início dos sintomas, 7 dias e 90 dias após.

Resultados: Em todo o grupo, a idade foi de $63,6 \pm 15,5$ anos; 54% eram homens. A média na escala do NIH foi de 8 ± 7 na admissão dos pacientes; após 3 meses o IB foi 88 ± 26 . Embora os níveis de ambos os marcadores estivessem elevados desde o início, os níveis de ET-1 (pg/ml) foram significativamente maiores nos pacientes com AIT quando comparados com AVC, em todos os pontos ($2,97 \pm 0,66$; $3,30 \pm 1,37$; $2,81 \pm 0,82$ versus $2,12 \pm 0,77$; $2,05 \pm 1,03$; $1,90 \pm 0,68$ na admissão, sete dias e três meses respectivamente, $p = 0,02$). Níveis de VCAM-1 (ng/ml) foram similares nos dois grupos de pacientes.

Conclusões: Níveis mais elevados de ET-1 em pacientes com AIT sugerem mecanismos fisiopatológicos distintos do endotélio vascular durante a isquemia cerebral de acordo com os diferentes subtipos de AVC.

Introdução

Os processos inflamatórios tem sido cada vez mais implicados na patogênese da aterosclerose^{1,2}; de fato, o processo aterosclerótico pode ser visto como uma resposta inflamatória celular e molecular³⁻⁵. Estes mecanismos também parecem ser importantes na patogênese das doenças cerebrovasculares^{6,7}.

Após a lesão vascular, a expressão de moléculas de adesão na superfície do endotélio vascular é considerada uma etapa precoce e crítica relacionada aos mecanismos aterotrombóticos, permitindo a aderência e transmigração das células inflamatórias na parede vascular^{3,8}. Em experimentos de isquemia cerebral, as células endoteliais cerebrais expressam moléculas de adesão como a molécula de adesão intercelular (ICAM)-1, molécula de adesão vascular (VCAM)-1 e E-seletina⁹. Estudos experimentais têm demonstrado marcado extravasamento de leucócitos nos sítios de isquemia cerebral mesmo após poucas horas de início do processo^{10,11}; o qual poderia ser mediado pelas moléculas de adesão. Neste sentido, dados experimentais indicam que o bloqueio da atividade das moléculas de adesão reduz a reação inflamatória local cerebral, o que pode ser benéfico no curso do acidente vascular cerebral (AVC)¹².

A maioria das moléculas de adesão é expressa somente na superfície celular, mas elas também podem ser liberadas na circulação sanguínea após serem clivadas da superfície celular¹³. Mensurações dos níveis plasmáticos destas moléculas podem ser vistas como uma avaliação da aterogênese, de disfunção endotelial e/ou inflamação as quais têm sido extensivamente estudadas no contexto da doença arterial coronariana, fatores de risco cardiovasculares¹⁴⁻¹⁷, e também nas doenças cerebrovasculares^{6,7,18,19}. Embora estudos prévios em pacientes com AVC tenham encontrado elevação nos níveis das diferentes moléculas de adesão, incluindo VCAM-1^{7,18,20}, permanece pouco

entendido se os níveis plasmáticos destas moléculas têm diferentes perfis quando comparados acidente isquêmico transitório (AIT) e AVC completo.

A endotelina (ET)-1, um potente peptídeo vasoconstritor, é liberada pelas células endoteliais sob uma grande variedade de insultos patogênicos. Esta é considerada um marcador de severidade em doença cardiovascular, indicando marcada disfunção endotelial²¹⁻²³. A atividade vasoconstritora da ET-1 tem sido extensivamente investigada em modelos experimentais de isquemia cerebral. Interessantemente, a ET-1 tem sido descrita como capaz de ações deletérias e também neuroprotetoras dentro do contexto neurovascular. De um lado, a intensa ação vasoconstritora da ET-1 pode causar dano adicional ao tecido cerebral devido à isquemia prolongada deste tecido como observado em modelos de ratos²⁴. Outros investigadores porém, têm demonstrado que a aplicação tópica exógena de ET-1 no córtex isquêmico leva à redução do coeficiente de transferência de pequenas moléculas hidrofílicas ao longo da barreira hematoencefálica e promove aumento do balanço entre o suprimento microvascular de oxigênio/consumo durante a isquemia cerebral²⁵. Apesar destes diversos estudos experimentais envolvendo ET-1 e isquemia cerebral, permanece indefinido o seu perfil e potenciais funções em humanos. Pouco é conhecido a respeito dos níveis de ET-1 nos diferentes tipos de AVC.

Assim, tanto mecanismos celulares e moleculares parecem estar implicados na patogênese das síndromes vasculares cerebrais envolvendo mediadores inflamatórios e marcadores de disfunção endotelial, como a VCAM-1 e ET-1, respectivamente. Pouco é conhecido do comportamento longitudinal destas moléculas no contexto das doenças cerebrovasculares em humanos, particularmente no que se refere às diferenças entre AIT e AVC completo, diferenças estas que podem ter implicações nos seus diferentes mecanismos patogénico envolvidos. Portanto, no presente estudo determinamos prospectivamente os níveis plasmáticos de VCAM-1 e ET-1 em pacientes com AVC

completo e AIT de forma seqüencial dentro dos 3 primeiros meses após o evento agudo.

Materiais e Métodos

População em estudo

Trinta e nove pacientes consecutivos com sinais clínicos de isquemia cerebral foram incluídos no estudo na sua admissão no Hospital de Clínicas de Porto Alegre e Hospital Mãe de Deus, Porto Alegre, RS, Brasil. O estudo incluiu pacientes com até 72h do início dos sintomas e somente apresentando um primeiro evento isquêmico cerebral. O diagnóstico foi definido com base na história clínica inicial e seguimento dos exames neurológicos e exames radiológicos usando a tomografia computadorizada (TC).

O tipo de AVC (completo ou AIT) foi classificado da seguinte forma: 1) déficit neurológico com duração ≤ 24 h foi definido como AIT, 2) se o déficit persistiu por > 24 h, o paciente foi classificado como tendo AVC completo. A etiologia do AVC foi definida pelos critérios do Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment (TOAST): 1) cardioembólico, 2) aterotrombótico de grandes vasos, 3) aterotrombótico de pequenos vasos, 4) causa indeterminada²⁶. O território vascular afetado foi definido segundo a TC de crânio. Se a neuroimagem não mostrasse qualquer lesão vascular recente, a classificação era baseada em achados clínicos e exame neurológico. Cada paciente foi submetido a um conjunto de exames diagnósticos que incluiu ecografia com Doppler dos vasos cervicais, ecocardiografia, eletrocardiograma, análises bioquímicas laboratoriais, as quais incluíram investigação para vasculites e coagulopatias. O exame clínico e a coleta das amostras de sangue (para medir VCAM-1 e ET-1) foram realizados na entrada no estudo (até 72h do início dos sintomas – admissão), 7 dias e 3 meses. Em cada ponto analisado, os déficits clínicos foram graduados de acordo com o *National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS)* (nenhum déficit = 0). O índice de Barthel (BI)(nenhum déficit = 100) foi aplicado no sétimo dia e em três meses. Nos pacientes com AIT, quando foi realizada a primeira coleta, os sintomas neurológicos já

havia desaparecido. Fatores de risco para AVC foram obtidos através da anamnese, exame físico, registros de internações prévias e análises laboratoriais.

Os critérios de exclusão consistiram de AVC prévio, sangramento cerebral, presença de infecções, outras doenças inflamatórias ou malignas, e condições associadas à lesão tecidual (infarto do miocárdio ou procedimentos cirúrgicos maiores) dentro do último ano, ou tratamento com imunossupressores. Os pacientes com achado radiológico de AVC isquêmico prévio foram também excluídos do estudo.

O estudo foi aprovado pelo comitê de ética de ambas as instituições e foi executado de acordo com os princípios da Declaração de Helsinki e normas institucionais. Foi obtido consentimento informado de todos os pacientes previamente à inclusão no estudo.

Amostras de Sangue e Quantificação de VCAM-1 e ET-1

Foi coletado sangue venoso (15ml) e colocado em um tubo contendo citrato ou ácido etilenodiamina tetraacético. As amostras foram centrifugadas e o plasma foi congelado a -70° C para subsequente análise cega realizada simultaneamente em todas as amostras. Antes da análise da ET-1, a sua extração foi realizada usando uma centrífuga com evaporação (Savant Instruments, Farmingdale, New York, NY, EUA) depois da diluição do plasma com solvente (40:5:1) de acetona, água e ácido clorídrico. As análises foram determinadas imediatamente após a extração. Tanto a ET-1 como a VCAM-1 foram medidas em duplicatas por enzima-imunoensaio (ELISA) (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA) (sensibilidade $< 2,0$ ng/ml para VCAM-1; sensibilidade $< 1,0$ pg/ml para ET-1).

Análise estatística

As variáveis contínuas foram expressas como média \pm desvio-padrão. As variáveis categóricas são expressas como porcentagem. A análise estatística foi realizada usando a versão 10 do programa SPSS para Windows e o programa SAS com a intenção de: 1) estudar os níveis de VCAM-1 e ET-1 ao longo do tempo após o evento cerebral, e 2) identificar diferenças nos níveis de VCAM-1 e ET-1 de acordo com os tipos de AVC. Com este propósito, ANOVA de dupla entrada para medidas repetidas foi usada para comparar variáveis ao longo do tempo em ambos os tipos de AVC considerando as diferenças dentro dos grupos e entre os grupos, seguido por uma análise *post-hoc* usando o teste de Student-Newman-Keuls. Demais comparações entre grupos foram realizadas usando teste *t* para variáveis contínuas e qui-quadrado para variáveis categóricas, respectivamente. O nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$.

Resultados

Características Clínicas e Neurológicas dos Pacientes

Dos 39 pacientes (idade $62,6 \pm 15,5$ anos), 21 eram homens e 18 mulheres. Trinta e quatro pacientes apresentaram-se com AVC completo e 5 com AIT. Quatro eventos foram categorizados como sendo cardioembólicos, 31 como não cardioembólicos (aterotrombóticos de grandes ou pequenos vasos) e quatro eventos foram de origem indeterminada. Em média, os pacientes foram incluídos no estudo dentro de 35 ± 14 horas do início dos sintomas. Os fatores de risco cardiovasculares mais prevalentes foram hipertensão, tabagismo e hipercolesterolemia, observados em ambos os tipos de AVC. Até o final do seguimento (3 meses), observamos somente um desfecho (morte), ocorrido no grupo do AIT. Tabela 1 apresenta as características demográficas dos pacientes.

Vinte pacientes já vinham em uso de aspirina ao ingressar no estudo. Pacientes com hipertensão usavam inibidores da enzima conversora da angiotensina, diuréticos, beta-bloqueadores e/ou bloqueadores dos canais de cálcio. Pacientes com diabetes melito estavam recebendo preparações de sulfoniluréia e/ou biguanidas. Nenhum paciente fazia uso de estatinas antes da inclusão. No seguimento, estatinas foram prescritas para todos os pacientes. Somente cinco pacientes com AVC completo receberam anticoagulação oral, todo o restante recebeu aspirina ou ticlopidina. O manejo clínico e o tratamento dos pacientes seguiram-se de acordo com diretrizes para manejo do AVC ²⁷.

Níveis de VCAM-1

Não houve diferença significativa nos níveis de VCAM-1 na admissão, 7 e 90 dias após o evento isquêmico no grupo geral de pacientes. Também, os níveis de

VCAM-1 não apresentaram diferenças significativas quando comparados os pacientes com AVC completo e AIT nos três momentos analisados, embora houvesse uma tendência para níveis mais elevados aos três meses, observada em pacientes com AVC completo, quando comparados com os pacientes com AIT ($p = 0,09$). Tabela 2. Figura 1. Nenhuma correlação foi encontrada entre os níveis de VCAM-1 em todos os momentos analisados e a severidade dos sintomas clínicos avaliados por IB e NIHSS (valores de “r” variaram de -0,33 a 0,20; $p > 0,05$).

Níveis de ET-1

No grupo total, os níveis de ET-1 não apresentaram qualquer variabilidade ao longo do tempo. Entretanto, os níveis de ET-1 foram diferentes conforme o tipo de isquemia cerebral. Os pacientes com AIT apresentaram níveis significativamente mais elevados de ET-1 do que nos pacientes com AVC completo, em todos os momentos analisados. Tabela 2. Figura 2. Nenhuma correlação significativa foi observada entre níveis de ET-1 e IB e NIHSS (valores de “r” variaram de -0,25 a 0,16, $p > 0,05$). Em três meses, no grupo como um todo houve uma tendência para níveis maiores de ET-1 em pacientes com etiologia cardioembólica ($p = 0,09$).

Discussão

Evidências crescentes indicam que aspectos imunoinflamatórios e disfunção endotelial podem ser igualmente importantes nas doenças cerebrovasculares como já bem definido nos eventos aterotrombóticos cardiovasculares^{6,7,28,29}. Vários eventos celulares e moleculares ocorrem nestes processos; entretanto, sabe-se pouco das funções específicas que alguns marcadores, como as moléculas de adesão e ET-1, têm no contexto da isquemia cerebral em humanos. Neste estudo, procuramos determinar o padrão dos níveis circulantes de VCAM-1 e ET-1 em pacientes apresentando um primeiro evento isquêmico cerebral agudo em três momentos seqüenciais, e comparar se existem diferenças relacionadas aos tipos de AVC: AIT e AVC completo. Nós mostramos que no grupo como um todo, os níveis de ambos os marcadores não apresentaram mudanças ao longo do tempo (admissão, 7 e 90 dias); no entanto, os níveis de ET-1 foram mais elevados em pacientes com AIT comparados com AVC completo.

Aspectos inflamatórios relacionados à isquemia cerebral

A isquemia cerebral produz ativação das células endoteliais a qual pode levar à expressão de moléculas de adesão como a VCAM-1, que pode ser liberada na corrente circulatória^{7,19}. Em modelos experimentais *in vitro* de isquemia cerebral, as células endoteliais cerebrais expressam altos níveis de moléculas de adesão⁹. A ausência do gene da ICAM-1 em camundongos *knockout*, reduziu de forma significativa o volume da área infartada após oclusão transitória da artéria cerebral média comparado com animais normais³⁰. Entretanto, em humanos a evidência de que as moléculas de adesão estão elevadas em pacientes com doença isquêmica cerebral não está bem definida. Diferentes estudos têm mensurado os níveis circulantes de VCAM-1 no sangue

periférico de pacientes, sendo as amostras coletadas dentro de 12 a 72h após o evento agudo do AVC^{18-20,31-36}, demonstrando resultados contraditórios.

Nós determinamos prospectivamente os níveis de VCAM-1 em pacientes com AIT e AVC completo dentro de 3 meses após o início dos sintomas neurológicos para definir seu padrão circulatório nestas duas apresentações. Apesar de não termos estudado indivíduos controles, os níveis estiveram elevados desde a admissão no hospital, tomando por base os níveis de VCAM-1 mensurados por outros investigadores em controles normais (em média < 670 ng/ml)^{19,37} e também conforme dados de nosso grupo que demonstrou valores em controles em média $734 \pm 97\text{ng/ml}$ ¹⁴. Os níveis observados de VCAM-1 em nossos pacientes com isquemia cerebral aguda, possivelmente indicam uma ativação do endotélio vascular neste contexto. Não encontramos diferenças nos valores deste marcador comparando-se a admissão, 7 e 90 dias após o evento isquêmico, exceto por uma tendência para níveis mais elevados em três meses nos pacientes com AVC completo. Portanto, não podemos definir o exato momento no qual ocorre o aumento nos níveis desta molécula no curso do AVC (nosso período de entrada foi até 72 h do início dos sintomas) tão pouco quando do retorno a valores tido como basais seguindo a resolução do evento. Finalmente, não encontramos diferenças significativas nos níveis de VCAM-1 entre pacientes com AVC completo e AIT, assim como outros investigadores^{19,20}, exceto como mencionado acima, por uma tendência para níveis maiores em 3 meses nos pacientes com AVC completo. Este achado pode simplesmente refletir uma maior evidência de atividade aterosclerótica total em pacientes com AVC, como outros já têm demonstrado³⁸, não necessariamente relacionado ao evento cerebrovascular agudo.

Níveis de ET-1 na isquemia cerebral

O papel das endotelinas na fisiologia cerebral não está claro, entretanto considerando sua intensa atividade vasoconstritora, poderia assumir-se que níveis elevados de ET-1 podem induzir hipóxia distal (dano tecidual isquêmico). De fato, de acordo com o conjunto das observações sobre ET-1 e isquemia cerebral, níveis elevados estão geralmente associados com envolvimento mais severo³⁹⁻⁴¹. Neste sentido, estudos prévios têm mostrado que níveis de ET-1 são significativamente maiores no líquido de pacientes com infartos corticais de grandes vasos do que em pacientes com pequenos infartos subcorticais⁴¹. Ziv *et al.* descreveram, em pacientes com AVC, que níveis plasmáticos maiores de ET-1 estiveram associados com déficits neurológicos maiores do que em pacientes com déficits menores³⁹.

Neste estudo, semelhante ao que foi encontrado com os níveis de VCAM, os níveis de ET-1 não apresentaram mudanças significativas ao longo do tempo em todo o grupo, mas foram inicialmente elevados, quando comparados a valores obtidos de controles individuais normais de estudos prévios do nosso grupo^{42,43}. O significado deste aumento de liberação de ET-1 durante a isquemia cerebral não está claro. Pode ser visto como causa ou consequência relacionada ao processo de lesão vascular aguda, ou como outros têm indicado, meramente refletindo o envolvimento aterosclerótico⁴⁴. Porém, considerando que a ET-1 está aumentada no contexto das doenças cerebrovasculares, Kobari *et al.* sugerem que poderia existir um efeito duplo, dose-dependente de ET-1 sobre a vasculatura e neurônios: constritivo (baixa-dose) e vasodilatador (alta-dose), através da indução da síntese de óxido nítrico, provavelmente pelo endotélio⁴⁵.

Quando nós analisamos os níveis de ET-1 de acordo com o tipo de isquemia cerebral, encontramos que pacientes com AIT apresentaram níveis significativamente

mais elevados de ET-1, em média 30-40% de elevação, do que os pacientes com AVC completo, nos três momentos estudados. Esta observação sugere diferentes mecanismos fisiopatológicos relacionados às células endoteliais na isquemia cerebral. Mecanismos de pré-condicionamento isquêmico têm sido recentemente descritos na lesão cerebrovascular, pelos quais episódios prévios de AIT poderiam favorecer a AVCs com menores consequências devastadoras no futuro. Os exatos mecanismos celulares e moleculares envolvidos neste processo estão sendo investigados^{46,47}. Rotas de proteção envolvendo mecanismos mediados por fluxo⁴⁸ poderiam envolver as ações vasoconstritoras da ET-1. Entretanto, uma hipótese atrativa para os níveis mais elevados de ET-1 nos pacientes com AIT quando comparados com pacientes com AVC completo, poderia levar a outro mecanismo de neuroproteção da ET-1 postulado por Narayanan *et al.* Em seu estudo experimental, foi observado que ET-1 exógena melhorou o balanço de oxigênio microvascular durante a isquemia cerebral focal. Isto se deve ao fato da ET-1 causar uma redistribuição do fluxo sanguíneo em questão e possivelmente melhorar o metabolismo dentro da área isquêmica. Assim, a endotelina exógena poderia através da vasoconstrição redistribuir o fluxo sanguíneo de regiões de maior fluxo para baixo fluxo dentro da área isquêmica⁴⁹. Ainda outro possível efeito benéfico da ET-1 na isquemia cerebral refere-se ao fato de que nela ocorre um aumento na transferência de pequenas moléculas hidrofílicas, e a aplicação tópica da ET-1 no córtex isquêmico atenua o grau de aumento no transporte destas pequenas moléculas através da barreira hemato-encefálica, não afetando assim regiões não-isquêmicas²⁵.

Níveis aumentados de ET-1 nos pacientes com AIT podem também representar uma resposta aos mecanismos de injúria por reperfusão⁵⁰. Está bem definido que a reperfusão ocorre seguindo a dissolução do êmbolo⁵¹. Interessantemente, nós observamos uma tendência para níveis maiores em pacientes com etiologia

cardioembólica (independente do tipo de AVC), o que está de acordo com achados por outros⁴⁴. Porém, sabe-se que anticoagulantes podem aumentar os níveis de ET-1; pacientes com etiologia cardioembólica foram anticoagulados no nosso estudo. Também poderia ser plausível que durante o AIT, a parede vascular reaja à injúria por meio de marcada vasoconstrição, na qual a ET-1 se apresentaria como o maior mediador. Com relação à relevância clínica deste mecanismo em humanos, outra especulação é de que ET-1 poderia limitar ou abolir a formação do *core* isquêmico (morte neuronal) como observado no AIT⁵²; níveis mais elevados de ET-1 estariam associados a eventos transitórios, sem dano cerebral permanente. Entretanto, como nossos dados são descritivos, estudos experimentais são necessários para esclarecer questões dos mecanismos causa-efeito envolvendo a ET-1 na isquemia cerebral e comparando os diferentes tipos de AVC

Limitações do estudo

A ausência de valores de indivíduos controle para as moléculas de interesse leva a certo grau de incerteza em definir que os níveis estavam de fato elevados. Entretanto, comparando os dados avaliados com valores publicados que usaram o mesmo *kit* comercial ELISA, nossos valores estiveram bem acima dos níveis normais esperados^{14,19,20,43,53}. Também, o período estudado, até três meses, pode não ter sido suficiente para que os níveis retornassem ao basal (abaixo dos iniciais, considerando os níveis da admissão). Assim, nós não podemos nos certificar do curso temporal destas moléculas na isquemia cerebral no período de três meses de observação. Finalmente o número reduzido de pacientes com AIT exige conclusões cuidadosas a respeito das diferenças observadas nos níveis de ET-1 neste grupo. Contudo, as diferenças foram consistentemente observadas nos três momentos avaliados.

Conclusões

Nós mostramos que em pacientes com evento cerebrovascular agudo, existe aumento nos níveis plasmáticos de VCAM-1 e ET-1, indicando atividade imunoinflamatória e disfunção endotelial como partes do processo. Além disso, enquanto os níveis de VCAM-1 estiveram igualmente elevados em pacientes com AVC completo e AIT, os níveis de ET-1 foram mais elevados em pacientes com AIT. A patogênese do AVC completo e do AIT apresentam algumas importantes diferenças que podem ser as responsáveis pelos achados do presente estudo. O AVC completo é mais dependente de uma ruptura da lesão aterotrombótica com ou sem o fenômeno embólico associado. Já o AIT é mais dependente de uma oclusão vascular focal secundária a embolização distal⁵². Ambos, VCAM-1 e ET-1, sinalizar tais diferenças. Estes dados descritivos originados de uma pequena amostra, sugerem que mecanismos patogénéticos do endotélio vascular não são igualmente comparáveis no desenvolvimento das diferentes síndromes cerebrovasculares. Estudos adicionais, com maior número de pacientes assim como modelos experimentais são necessários para explorar mais minuciosamente estas novas observações na doença cerebrovascular.

Referências Bibliográficas

1. Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999;340:115-126.
2. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation.* 2002;105:1135-1143.
3. Blake GJ, Ridker PM. Novel clinical markers of vascular wall inflammation. *Circulation.* 2001;89:763-771.
4. Ridker PM. On evolutionary biology, inflammation, infection, and the causes of atherosclerosis. *Circulation.* 2002;105:2-4.
5. Harrison DG. Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J Clin Invest.* 1997;100:2153-2157.
6. Frijns CJM, Kapelle LJ. Inflammatory cell adhesion molecules in ischemic cerebrovascular disease. *Stroke.* 2002;33:2115-2122.
7. Fassbender K, Bertsch T, Mielke O, Mühlhauser F, Hennerici M. Adhesion molecules in cerebrovascular diseases: evidence for an inflammatory endothelial activation in cerebral large and small vessel disease. *Stroke.* 1999;30:1647-1650.
8. Fries J, Williams A, Atkins R, Newman W, Lipscomb M, Collins T. Expression of VCAM-1 and E-selectin in an in vivo model of endothelial activation. *Am J Pathol.* 1993;143:725-37.
9. Stanimirovic DB, Wong J, Shapiro A, Durkin JP. Increase in surface expression of ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin in human cerebromicrovascular endothelial cells subjected to ischemia-like insults. *Acta Neurochir Suppl (Wien).* 1997;70:12-16.

10. del Zoppo GJ, Schmid-Schonbein GW, Mori E, Copeland BR, Chang C-M. Polymorphonuclear leukocytes occlude capillaries following middle cerebral artery occlusion and reperfusion in baboons. *Stroke*. 1991;22:1276-1283.
11. Matsuo Y, Onodera H, Shiga Y, Nakamura M, Ninomiya M, Kihara T, Kogure K. Correlation between myeloperoxidase-quantified neutrophil accumulation and ischemic brain injury in the rat: effects of neutrophil depletion. *Stroke*. 1994;25:1469–1475.
12. DeGraba TJ. The role of inflammation after acute stroke: utility of pursuing anti-adhesion molecule therapy. *Neurology*. 1998;51:S62-8.
13. Gearing AJ, Newman W. Circulating adhesion molecules in disease. *Immunol Today*. 1993;14:506-512.
14. Clausell N, Prado KF, Ribeiro JP. Increased plasma levels of soluble vascular cellular adhesion molecule-1 in patients with chest pain and angiographically normal coronary arteries. *Int J Cardiol*. 1999;68:275-280.
15. Ridker PM, Hennekens CH, Roitman-Johnson B, Stampfer MJ, Allen J. Plasma concentration of soluble intercellular adhesion molecule 1 and risks of future myocardial infarction in apparently healthy men. *Lancet*. 1998;351:88–92.
16. Blann AD, Amiral J, McCollum CN. Circulating endothelial cell leucocyte adhesion molecules in ischemic heart disease. *Br J Haematol*. 1996;95:263-265.
17. Egashira K. Clinical importance of endothelial function in arteriosclerosis and ischemic heart disease. *Circulation*. 2002;66:529-533.
18. Fassbender K, Mossner R, Motsch L, Kischka U, Grau A, Hennrich M. Circulating selectin- and immunoglobulin-type adhesion molecules in acute ischemic stroke. *Stroke*. 1995:1361-1364.

19. Frijns CJM, Kappelle LJ, van Gijn J, Nieuwenhuis HK, Sixma JJ, Fijnheer R. Soluble adhesion molecules reflect endothelial cell activation in ischemic stroke and in carotid atherosclerosis. *Stroke*. 1997;28:2214–2218.
20. Bitsch A, Klene W, Murtada L, Prange H, Rieckmann P. A longitudinal prospective study of soluble adhesion molecules in acute stroke. *Stroke*. 1998;29:2129-2135.
21. Levin RE. Endothelins. *N Engl J Med*. 1995;333:356-363.
22. Masaki T. Historical review: endothelin. *Trends Pharmacol Sci*. 2004;25:219-224.
23. Liao JK. Endothelium and acute syndromes. *Clin Chem*. 1998;44:1799-1808.
24. Barone FC, Willette RN, Yue T-L, Feuerstein G. Therapeutic effects of endothelin receptor antagonists in stroke. *Neurol Res*. 1995;17:259-264.
25. Chi OZ, Liu X, Weiss HR. Effects of endothelin-1 on blood-brain barrier permeability during focal cerebral ischemia in rats. *Exp Brain Res*. 2001;141:1-5.
26. Adams Jr HP, Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, Marsh EEI. Classification of subtype of acute ischemic stroke. *Stroke*. 1993;24:35-41.
27. Adams Jr HP, Adams RJ, Brott T, del Zoppo GJ, Furlan A, Goldstein LB, Grubb RL, Higashida R, Kidwell C, Kwiatkowski TG, Marler JR, Hademenos GJ. Guidelines for the early management of patients with ischemic stroke: a scientific statement from the stroke council of the American Stroke Association. *Stroke*. 2003;34:1056-1083.
28. Blann AD, Path MRC, Ridker PM, Lip GYH. Inflammation, cell adhesion molecules, and stroke: tool in pathophysiology and epidemiology? *Stroke*. 2002;33:2141-2143.
29. Kozuka K, Kohriyama T, Nomura E, Ikeda J, Kajikawa H, Nakamura S. Endothelial markers and adhesion molecules in acute ischemic stroke--

- sequential change and differences in stroke subtype. *Atherosclerosis*. 2002;161:161-168.
30. Soriano SG, Coxon A, Wang YF, Frosch MP, Lipton SA, Hickey PR, Mayadas TN. Mice deficient in Mac-1 (CD11b/CD18) are less susceptible to cerebral ischemia/reperfusion injury. *Stroke*. 1999;30:134–139.
 31. Shyu KG, Chang H, Lin CC. Serum levels of intercellular adhesion molecule-1 and E-selectin in patients with acute ischemic stroke. *J Neurol*. 1997;244:90–93.
 32. Blann A, Kumar P, Krupinski J, McCollum C, Beevers DG, Lip GY. Soluble intercellular adhesion molecule-1, E-selectin, vascular cell adhesion molecule-1 and von Willebrand factor in stroke. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1999;10:277–284.
 33. Clark WM, Coull BM, Briley DP, Mainolfi E, Rothlein R. Circulating intercellular adhesion molecule-1 levels and neutrophil adhesion in stroke. *J Neuroimmunol*. 1993;44:123–125.
 34. Wu G, Li F, Li P, Ruan C. Detection of plasma alpha-granule membrane protein GMP-140 using radiolabeled monoclonal antibodies in thrombotic diseases. *Haemostasis*. 1993;23:121–128.
 35. Kim JS. Cytokines and adhesion molecules in stroke and related diseases. *J Neurol Sci*. 1996;137:69-78.
 36. Fiszer U, Korczak-Kowalska G, Palasik W, Korlak J, Gorski A, Czlonkowska A. Increased expression of adhesion molecule CD18 (LFA-1beta) on the leukocytes of peripheral blood in patients with acute ischemic stroke. *Acta Neurol Scand*. 1998;97:221–224.
 37. Lemos JA, Hennekens C, Ridker PM. Plasma concentration of soluble vascular cell adhesion molecule-1 and subsequent cardiovascular risk. *J Am Coll Cardiol*. 2000;36:423-426.

38. Abliz H, Meinders A. C-reactive protein: history and revival. *Eur J Intern Med.* 2002;13:412.
39. Ziv I, Fleminger G, Archiron A, Melamed E, Sokolovski M. Increased plasma endothelin-1 in acute ischemic stroke. *Stroke.* 1992;23:1014-1016.
40. Estrada V, Téllez MJ, Moya J, Fernández-Durango R, Egido J, Cruz AF. High plasma levels endothelin-1 and atrial natriuretic peptide in patients with acute ischemic stroke. *Am J Hypertens.* 1994;7:1085-1089.
41. Lampl Y, Fleminger G, Gilad R, Galtron R, Sarova-Pinhas I, Sokolovski M. Endothelin in cerebrospinal fluid and plasma of patients in the early stage of ischemic stroke. *Stroke.* 1997;28:1951-1955.
42. Brauner JS, Rohde LE, Clausell N. Circulating endothelin-1 and tumor necrosis factor-alpha: early predictors of mortality in patients with septic shock. *Intensive Care Med.* 2000;26:305-13.
43. Seligman BG, Biolo A, Polanczyk CA, Gross JG, Clausell N. Increased plasma levels of endothelin-1 and von Willebrand factor in patients with type 2 diabetes and dyslipidemia. *Diabetes Care.* 2000;23:1395-1400.
44. Anwaar I, Gottsater A, Lindgarde F, Mattiasson I. Increasing plasma neopterin and persistent plasma endothelin during follow-up after acute cerebral ischemia. *Angiology.* 1999;50:1-8.
45. Kobari M, Fukuuchi Y, Tomita M, Tanahashi N, Konno S, Takeda H. Cerebral vasodilatory effect of high-dose intravascular endothelin-1: inhibition by NG-monomethyl-L-arginine. *J Auton Nerv Syst.* 1994;49:111-115.
46. Wegener S, Gottschalk B, Jovanovic V, Knab R, Fiebach JB, Schellinger PD, Kucinski T, Jungehülsing GJ, Brunecker P, Muller B, Banasik A, Amberger N, Wernecke KD, Siebler M, Röther J, Villringer A, Weih M. Transient ischemic

- attacks before ischemic stroke: preconditioning the human brain? A Multicenter Magnetic Resonance Imaging Study. *Stroke*. 2004;35:616-621.
47. Weih M, Kallenberg K, Bergk A, Dirnagl U, Harms L, Wernecke KD, Einhüpl KM. Attenuated stroke severity after prodromal TIA: a role for ischemic tolerance in the brain? *Stroke*. 1999;1999:1851–1854.
 48. Stagliano NE, Perez-Pinzon MA, Moskowitz MA, Huang PL. Focal ischemic preconditioning induces rapid tolerance to middle cerebral artery occlusion in mice. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1999;19:757–761.
 49. Narayanan U, Weiss HR, Liu X, Chi OZ. Exogenous endothelin-1 improves microvascular oxygen balance during focal cerebral ischemia in the rat. *Regulatory Peptides*. 2002;105:1-7.
 50. Matsuo Y, Mihara S, Ninomiya M, Fujimoto M. Protective effect of endothelin type A receptor antagonist on brain edema and injury after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke*. 2001;32:2143-8.
 51. Schaller B, Graf R. Cerebral ischemia and reperfusion: the pathophysiologic concept as a basis for clinical therapy. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2004;24:351-71.
 52. Caplan LR. Basic pathology, anatomy, and pathophysiology of stroke. In: Caplan LR, ed. *Caplan's Stroke: A Clinical Approach*. Third ed. Boston: Butterworth Heinemann; 2000:17-50.
 53. Haapaniemi E, Tatlisumak T, Hamel K, Soinnie L, Lanni C, Opgenorth TJ, Kaste M. Plasma endothelin-1 neither increase nor correlated with neurological scores, stroke risk factors, or outcome in patients with ischemic stroke. *Stroke*. 2000;31:720-725.

Tabela 1. Características Clínicas da População em Estudo (n = 39)

	AVC	AIT	p
n	34	5	
Idade (anos)	64 ±13	53 ± 23	0,42
Sexo (M/F)	18/16	3/2	0,57
Hipertensão, n (%)	29 (85)	3 (60)	0,21
Tabagismo Atual, n (%)	18 (52)	3 (60)	0,58
Hipercolesterolemia, n (%)	16 (47)	2 (40)	0,57
História Familiar, n (%)	6 (17)	1 (20)	0,65
Diabete Melito, n (%)	13 (38)	1 (20)	0,4
Doença Cardíaca Prévia			
- <i>Fibrilação Atrial, n (%)</i>	3 (9)	0	0,65
- <i>Doença Arterial Coronariana, n (%)</i>	2 (6)	0	0,76
Contraceptivos Orais, n(%)	1 (3)	0	0,87
Enxaqueca, n (%)	2 (6)	0	0,76
NIHSS (admissão)	9 ± 7	0	-
NIHSS (7 dias)	8 ± 7	0	-
NIHSS (3 meses)	5 ± 6	0	-
Índice de Barthel (7 dias)	55 ± 37	100	-
Índice de Barthel (3 meses)	87 ± 27	100	-
TOAST			-
- <i>Cardioembólico, n (%)</i>	3 (9)	1 (20)	-
- <i>Aterotrombótico grandes vasos, n (%)</i>	14 (41)	1 (20)	-
- <i>Aterotrombótico pequenos vasos, n (%)</i>	16 (47)	0	-
- <i>Indeterminado, n (%)</i>	1 (3)	3 (60)	-

Variáveis contínuas expressas como média ± SD

Tabela 2. Níveis de ET-1 e VCAM-1 nos três momentos analisados

	Todos (n = 39)	AVC Completo (n = 34)	AIT (n = 5)	p*
VCAM-1 (admissão)	758 ± 240	772 ± 241	662 ± 240	0,34
VCAM-1 (7dias)	857 ± 317	865 ± 299	809 ± 457	0,72
VCAM-1(3 meses)	853 ± 338	892 ± 334	582 ± 241	0,09
p**	0,60	0,34	0,78	
ET-1 (admissão)	2,23 ± 0,80	2,12 ± 0,77	2,97 ± 0,66	0,02
ET-1 (7 dias)	2,22 ± 1,14	2,05 ± 1,03	3,30 ± 1,37	0,02
ET-1 (3 meses)	2,02 ± 0,75	1,90 ± 0,68	2,81 ± 0,82	0,02
p**	0,37	0,86	0,61	

Valores são médias ± DP; ET-1 expressa em pg/ml; VCAM-1 expressa em ng/ml.

p* indica diferenças comparando AVC completo e AIT

p** indica comparação ao longo do tempo nos três pontos para cada marcador

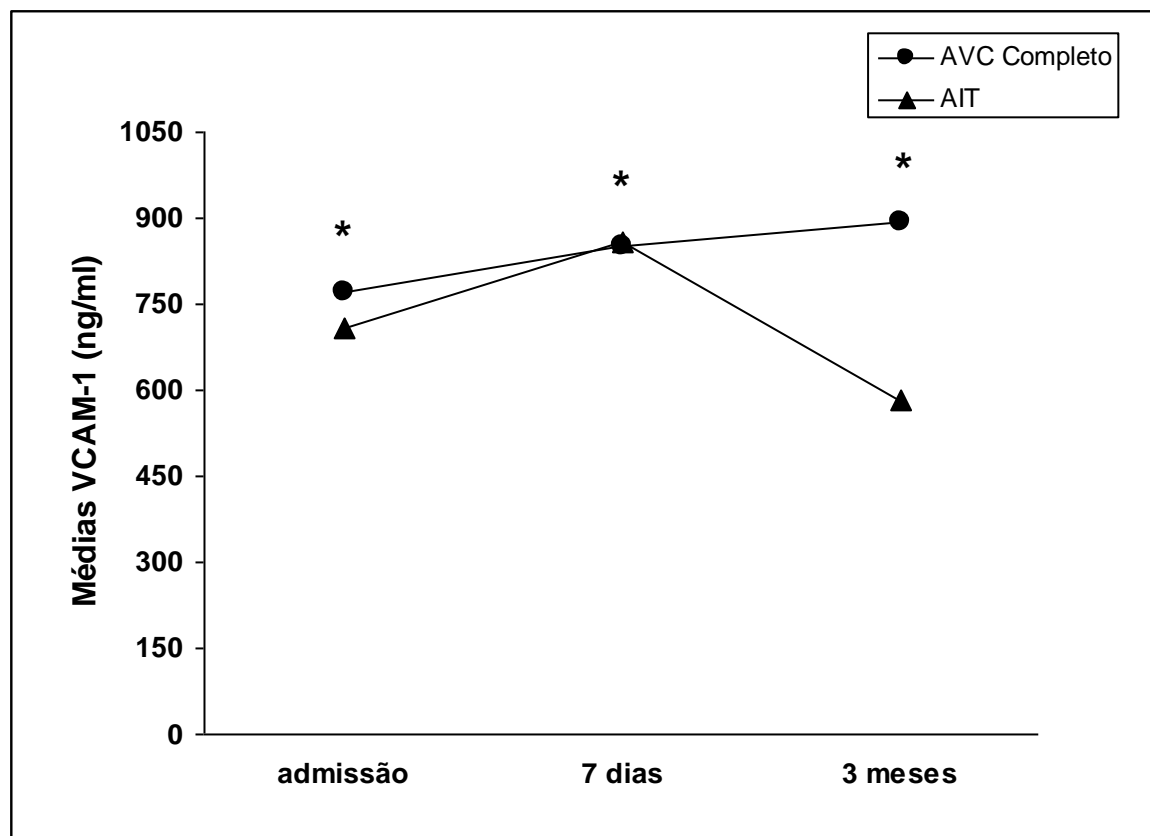


Figura 1.

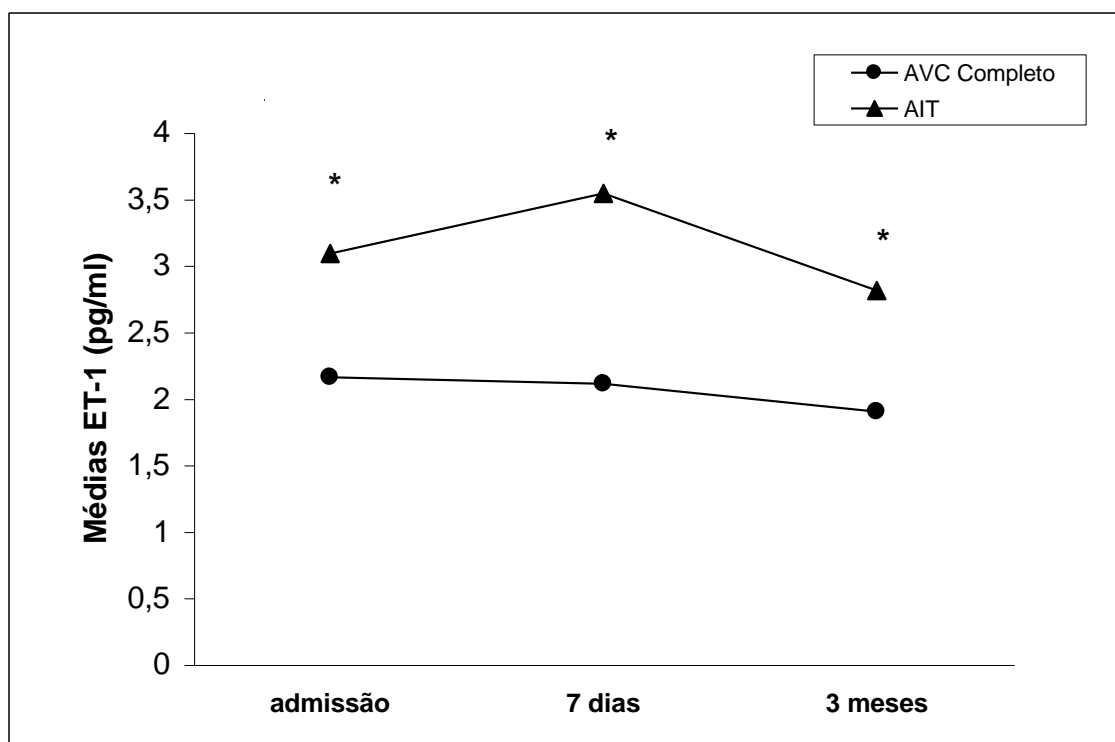


Figura 2.

Figura 1. Níveis de VCAM-1 em AVC completo e AIT em todos os momentos. ANOVA de dupla entrada para medidas repetidas: nenhuma diferença significativa foi observada dentro de cada grupo ou entre os grupos ao longo do tempo. Não se observou interação entre tempo e grupos. * $p > 0,05$ para comparação entre grupos em todos os momentos. Nota: em cada momento, somente os dados completos de cada paciente foram analisados.

Figura 2. Níveis de ET-1 em AVC completo e AIT em todos os momentos. ANOVA de dupla entrada para medidas repetidas: os níveis nos pacientes com AIT foram significativamente maiores do que nos pacientes com AVC completo, em todos os momentos. Nenhuma diferença foi observada dentro de cada grupo ao longo do tempo e não houve interação entre tempo e grupos. * $p = 0,01$ para comparação entre grupos. Nota: em cada momento, somente os dados completos de cada paciente foram analisados.

Anexo I

Termo de Consentimento Informado

Título: Marcadores de Disfunção Endotelial em Pacientes com Doença Vascular Cerebral Isquêmica.

A doença cerebrovascular conhecida como “derrame cerebral” é uma doença grave e a mais comum do sistema nervoso central, sendo importante causa de morte e de incapacitação.

Este projeto de pesquisa tem por objetivo estudar os marcadores de disfunção endotelial em pacientes com doença cerebrovascular isquêmica aguda, ou seja, substâncias que possam fornecer informações sobre o estado de inflamação dos vasos sanguíneos. Sabemos que a inflamação é um fator muito importante na causa do AVC Isquêmico (“derrame cerebral”), e para podermos preveni-lo precisamos poder quantificar o grau de inflamação.

Para medirmos estas substâncias no sangue, faz-se necessário a retirada de aproximadamente 15 ml de sangue através de uma simples punção na veia do antebraço com agulha o que pode causar um pequeno desconforto com dor no local da picada e também uma mancha arroxeadada no local que desaparecerá mais tarde. Serão feitas três coletas de sangue: nas primeiras 24h da chegada ao hospital, no terceiro dia e no terceiro mês após o início do “derrame cerebral”.

O tempo de duração do acompanhamento do paciente será de três meses, quando serão feitas as três coletas de sangue e a avaliação neurológica do paciente. Como nas duas primeiras coletas e avaliações, o paciente estará internado no hospital, será necessário o deslocamento até o hospital somente para a última coleta e avaliação neurológica.

Desejamos com esta pesquisa entender novas causas de doença cerebrovascular e com isso reduzir o número de pessoas que sofrem desta doença ou

possam ter novos “derrames cerebrais”, reduzindo o número de mortes e seqüelas por esta doença.

Fica assegurado ao paciente, o direito de não participar ou de se retirar desta pesquisa, a qualquer momento, sem que isto represente qualquer tipo de prejuízo para o seu atendimento médico hospitalar. Também asseguramos que o nome do paciente ou as informações obtidas será guardado no mais completo sigilo.

Eu, _____, concordo em participar da pesquisa “Marcadores de Disfunção Endotelial em Pacientes com Doença Vascular Cerebral Isquêmica”.

Porto Alegre, _____ de _____ de 2.000.

Nome do paciente ou representante legal.

Dra. Nadine Clausell

Médica orientadora responsável.

Dra. Rosane Brondani

Médica pesquisadora responsável.

Telefone para contato: 051- 30291474

Anexo II

Protocolo Marcadores Disfunção Endotelial

Número:..... Prontuário:.....
 Nome:
 Idade: Data de nascimento:.....
 Sexo: (1) masculino (2) feminino
 Raça: (1) branco (2) preto (3) misto (4) outro
 Estado civil: (1) casado / companheiro (2) solteiro (3) separado (4) viúvo
 Profissão:.....
 Naturalidade:.....
 Endereço:.....
 Telefone:.....Telefone vizinho/parente:.....
 Data do atendimento:...../...../.....

História

1. Queixa principal:.....
2. Hist.atual:.....

- 2.1. Tempo do início dos sintomas:.....
- 2.2. Sinal / sintoma: (1) alteração da força
 (2) alteração da sensibilidade
 (3) alteração da consciência
 (4) alteração da fala
 (5) alteração da visão

(6) alteração do equilíbrio / coordenação

(7) outro:

3. Fatores de risco:

DCV prévia ()

Tabagismo ()

Hipertensão ()

Diabete melito ()

Dislipidemia ()

Obesidade ()

Hist. Familiar ()

Alcoolismo ()

Sedentarismo ()

Uso de ACO ()

Enxaqueca ()

Reposição hormonal ()

4. Outras doenças associadas:

Cardiopatia ()

Vasculopatia ()

D. reumática ()

D. Coagulação ()

5. Outras doenças:

.....

.....

.....

.....

.....

Exames Complementares:

1. Imagem

1.1) TCC 1 (/ /): (1) normal (2) alterado (3) não realizado (9) ignorado

Descrição:

.....
 1.2) TCC 2 (/ /): (1) normal (2) alterado (3) não realizado (9) ignorado

.....
 1.3) Ecocárdio (/ /): (1) normal (2) alterado (3) não realizado (9) ignorado

FE:

Disfunção diastólica: (1) sim (2) não

Defeitos de septo: (1) sim (2) não

Valvulopatia: (1) sim (2) não

Trombos: (1) sim (2) não

Outros achados:.....

.....
 1.4) Eco transesofágico (/ /): (1) normal (2) alterado (3) não realiz. (9) ignor

Descrição:.....

.....
 1.5) Eco de carótidas e vertebrais (/ /): (1) normal (2) alter (3) não realiz

(9) ignor

Descrição:.....

.....
 1.6) ECG (/ /): (1) normal (2) alterado (3) não realiz (9) ignorado

Descrição:

2. Laboratório:

2.1) Glicemia:.....

2.2) Colesterol total: HDL: LDL: Triglic:.....

2.3) Ht: Hb: Leuc:..... Plaq:.....

2.4) Creatinina: Uréia:.....

2.5) Na:..... K: Ca:..... Mg:.....

2.6) TP:..... INR:.....

2.7) KTTTP:.....

2.8) TGO: TGP:.....

2.9) TSH:..... T4:.....

2.10) VSG:.....

2.11) EQU: (1)normal (2) alterado

2.12) VDRL: (1) não reagente (2) reagente

2.13) IFI Lues: (1) não reagente (2) reagente

2.14) HIV: (1) não reagente (2) reagente

DIAGNÓSTICO:

.....

Medicamentos usados :

Nome:

Dose:

1).....
2).....
3).....
4).....
5).....
6).....
7).....
8).....
9).....
10).....

Intercorrências Hospitalares/ambulatoriais:

.....

Anexo III

Escala de AVC do *National Institute of Health*

		Admis	7d	90d			
1. Estado mental 1a. Nível de Consciência	Alerta Sonolento Torporoso Coma						
1b. Orientação (mês, idade)	Ambas respostas corretas Uma resposta correta Incorretas						
1c. Comandos (abrir/fechar olhos, apertar a mão e soltar)	Obedece ambos corretamente Obedece um corretamente Incorreto						
2. Olhar (olhos abertos - paciente acompanha o dedo do examinador)	Normal Paralisia parcial do olhar Desvio conjugado						
3. Visual (analisar perimetria)	Sem perda visual Hemianopsia parcial Hemianopsia completa Hemianopsia bilateral						
4. Paralisia facial (mostrar dentes, enrugar testa, fechar olhos)	Normal Mínima Parcial Completa						
5. Motricidade em Membro Superior 5a. Esquerdo (membro elevado a 90° e mantido por 10 segundos)	Sem desvio Com desvio Não resiste à gravidade Nenhum movimento contra gravidade Sem movimento Amputado, derrame articular (explicar)						
5b. Direito (membro elevado a 90° e mantido por 10 segundos)	Sem desvio Com desvio Não resiste à gravidade Nenhum movimento contra gravidade Sem movimento Amputado, derrame articular(explicar)						
6. Motricidade em Membro Inferior 6a. Esquerdo (membro elevado a 30° e mantido por 5 segundos)	Sem desvio Com desvio Não resiste à gravidade Nenhum movimento contra gravidade Sem movimento Amputado, derrame articular(explicar)						
6b. Direito (membro elevado a 30° e mantido por 5 segundos)	Sem desvio Com desvio Não resiste à gravidade Nenhum movimento contra gravidade Sem movimento Amputado, derrame articular(explicar)						
7. Ataxia de membros (testes do índice-nariz e calcanhar-joelho)	Ausente Presente em um membro Presente em dois membros						
8. Sensibilidade (Em face, braço e perna - comparar os dois lados)	Normal Perda parcial Perda severa						
9. Linguagem (Nomear itens - caneta, relógio-, descrever figuras e ler sentenças)	Sem afasia Afasia leve a moderada Afasia grave Afasia total						
10. Disartria (Avaliar clareza da fala fazendo o paciente repetir palavras listadas: episcopal, presbiteriano, microfone)	Articulação Normal Disartria leve a moderada Quase inteligível ou pior Entubado ou outra barreira física						

11. Negligência (Usar informação da testagem prévia para identificar negligência ou extinção)	Sem negligência Negligência parcial Negligência completa						
	ESCORE TOTAL						
	Avaliado por:						

Se item não for avaliado, escrever **N/A**.

Somar a pontuação total e identificar o número de 'X'

Anexo IV

Avaliação Funcional: **Índice de Barthel**

I. "posso fazer sozinho"

II. "posso fazer com auxílio de uma pessoa"

III. "não posso fazer"

Índice de Cuidados Próprios

	I	II	III
1. beber de uma xícara	(4)	(0)	(0)
2. comer	(6)	(0)	(0)
3. vestir o corpo superior	(5)	(3)	(0)
4. vestir o corpo inferior	(7)	(4)	(0)
5. colocação membro artificial	(0)	(-2)	(0)
6. cuidados com a aparência (barbear-se, pentear-se, escovar os dentes)	(5)	(0)	(0)
7. tomar banho	(6)	(0)	(0)
8. controle urinário	(10)	(5)	(0)
9. controle intestinal	(10)	(5)	(0)

Índice de Mobilidade

10. sair e sentar em uma cadeira	(15)	(7)	(0)
11. ir ao banheiro, incluindo realização de higiene pessoal e vestir-se	(6)	(3)	(0)
12. ir e sair do chuveiro	(1)	(0)	(0)
13. caminhar cerca de 50 metros em uma superfície plana	(15)	(10)	(0)
14. subir e descer escadas se não caminha:	(10)	(5)	(0)
15. impulsionar cadeira de rodas	(5)	(0)	(0)
	100 ()	Escore Total	

Pontuação:

-Admissão:

-7 dias:

-3 meses: