

**EDUARDO SIQUEIRA WAIHRICH**

**ATIVAÇÃO *IN VITRO* DE NEUTRÓFILOS EXPOSTOS A STENTS CAROTÍDEOS  
DE NITINOL E COBALTO-CROMO**

**BRASÍLIA, 2013**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**EDUARDO SIQUEIRA WAIHRICH**

**ATIVAÇÃO *IN VITRO* DE NEUTRÓFILOS EXPOSTOS A STENTS CAROTÍDEOS  
DE NITINOL E COBALTO-CROMO**

**Dissertação apresentada como requisito parcial para a  
obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde  
pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da  
Saúde da Universidade de Brasília.**

**Orientador: Dra. Iruena Moraes Kessler**

**BRASÍLIA  
2013**

**EDUARDO SIQUEIRA WAIHRICH**

**ATIVACÃO *IN VITRO* DE NEUTRÓFILOS EXPOSTOS A STENTS CAROTÍDEOS  
DE NITINOL E COBALTO-CROMO**

**Dissertação apresentada como requisito parcial para a  
obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde  
pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da  
Saúde da Universidade de Brasília.**

**Aprovado em 10 de dezembro de 2013.**

**BANCA EXAMINADORA**

**Dra. Iruena Moraes Kessler - (presidente)  
Universidade de Brasília - UnB**

**Dr. Luiz Augusto Casulari Roxo da Motta  
Universidade de Brasília - UnB**

**Dr. Vitorio Campos da Silva  
Associação Educativa Evangélica - AEE**

*Dedico este trabalho à minha amada esposa,  
Daniele, pela paciência, compreensão e  
cumplicidade em mais essa etapa de nossas  
vidas; e ao meu vasto complexo familiar: pais,  
irmãos, tios, primos e sogros, pelo amor,  
educação, apoio e oportunidade de crescimento e  
aprendizado.*

## **AGRADECIMENTOS**

Aos professores e tutores Dra. Iruena Kessler, Dr. Carlos Silvério, Dr. Vitório Campos da Silva e Dr. Wagner Fontes, que me incentivaram a realizar este mestrado.

Ao grande amigo do laboratório de bioquímica: Rodrigo André Sousa, se não fosse por sua ajuda, este trabalho não estaria concluído.

Aos amigos, colegas e companheiros que gentilmente se voluntariaram a fazer parte deste estudo.

*"Wyrð bið ful aræd"*  
(Bernard Cornwel)

## RESUMO

**Introdução:** A angioplastia de carótida com interposição de stent (AS) é uma alternativa para tratamento da doença aterosclerótica oclusiva. Em médio prazo, a maior complicação da AS é a re-estenose intra-Stent (4,8% em 2 anos), cujo principal fator desencadeante é a resposta inflamatória tipo corpo estranho contra o Stent Carotídeo. Estão disponíveis diferentes tipos de SC, formados basicamente por duas ligas metálicas diferentes: liga de cobalto-cromo (CoCr) (WallStent®) e de Nitinol (NiTi) (Protege®).

**Método:** Comparamos as características estruturais e a ativação inflamatória dos neutrófilos quando expostos aos dois tipos de SC, aferindo a produção de radicais livres por meio de espectroscopia óptica. 20 ml de sangue de 19 voluntários hígidos foram centrifugados em gradiente de Percoll® para separação dos neutrófilos. Os neutrófilos foram expostos à superfície do Stent por períodos de 40 minutos, em solução com o Nitro Blue Tetrazolium. Após o período de incubação, os resultados foram mensurados em transmitância por espectrofotometria óptica, utilizando comprimento de onda de 550 nm conforme técnica padrão. A seguir, um exemplar de cada amostra foi enviado à microscopia eletrônica de varredura para análise estrutural dos stents carotídeos e dos neutrófilos aderidos.

**Resultados:** A leitura do espectrofotômetro evidenciou que a liga de NiTi desencadeou maior produção estatisticamente significativa de espécies reativas de oxigênio que a liga de CoCr (0,115 +/- 0,058 vs 0,081 +/- 0,050 em transmitância; p = 0,002 e IC95% 0,00052 a 0,0534). As imagens de microscopia eletrônica sugerem que a secção transversal da malha de NiTi é retangular e que a de CoCr é cilíndrica. As duas ligas foram capazes de ativar a formação de radicais livres pelos neutrófilos. A liga de NiTi apresentou significativamente maior reatividade que a liga de CoCr.

**Conclusão:** Esse resultado pode estar relacionado à maior e mais precoce liberação de íons níquel pela liga de NiTi.

Palavras-chave: angioplastia de carótida; stent carotídeo; atividade inflamatória; radicais livres; neutrófilos; microscopia eletrônica de varredura.

## ABSTRACT

**Introduction:** Carotid artery Stenting (CAS) is an alternative treatment to the atherosclerotic occlusive disease. In the medium term, the main complication of CAS is the in-Stent restenosis (4.8% in 2 years), for which the main triggering factor is the foreign body inflammatory response to the Carotid Stent (CS). There are different types of CS available, and they basically consist of two different alloys: cobalt-chrome (WallStent®) and Nitinol (Protégé®).

**Method:** This study compared the structural characteristics and the inflammatory activation of neutrophils when exposed to both types of CS, checking the production of free radicals with the use of optical spectroscopy. 20 ml of blood collected from 19 healthy volunteer patients were centrifuged using the Percoll method for neutrophil separation. Neutrophils were exposed to the Stent surface for 40-minute periods Nitro Blue Tetrazolium (NBT) in solution. After the incubation period, the results were transmittance-measured using an optical spectrophotometer, at 550 nm wavelength, as standard procedures. After that, a portion of each sample was sent for scanning electron microscopy and morpho-physiological analysis of the CS and the adherent neutrophils.

**Results:** Spectrophotometer reading showed that the NiTi alloy was responsible for a statistically significant increased production of reactive species of oxygen when compared to the CoCr alloy (0.115 +/- 0.058 vs 0.081 +/- 0.050 transmittance level,  $p = 0.002$  and CI 95% 0.00052 to 0.0534). Scanning electron microscope images showed that the NiTi CS mesh has rectangular cross sections, and the CoCr CS mesh has cylindrical cross sections. Both alloys triggered free radical formation by neutrophil activation.

**Conclusion:** The NiTi alloy showed significantly higher reactivity than the CoCr alloy. This result may be caused by a greater and earlier release of nickel ions by the NiTi alloy.

**Keywords:** carotid angioplasty; carotid stenting; inflammatory activity; free radicals; neutrophils; scanning electron microscopy.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Dinâmica do fluxo na bifurcação carotídea: A) Artéria Carótida Interna; B) Artéria Carótida Externa; C) Artéria Carótida Comum; D) Bulbo Carotídeo; E) Fluxo laminar intra-arterial; F) Fluso turbilhonado pelo stress hemodinâmico e menor força de cisalhamento; G) Placa ateromatosa; H) Parede externa da Artéria Carótida Interna – local de maior deposição de material lipídico (Arquivo pessoal).....	19
Figura 2. Exposição e clameamento da Artéria Carótida Comum (A), da Artéria Carótida Externa (B) e da Artéria Carótida Interna (C). O tracejado evidencia o incisão da arteriotomia (modificado e autorizado utilização por 12) .....	24
Figura 3. Arteriotomia e retirada da placa ateromatosa com o dissector de Penfield (A) (modificado e autorizado utilização por 12).....	25
Figura 4. Sala de angiografia com um aparelho monoplano (Arquivo pessoal).....	27
Figura 5. Desenho esquemático do processo de angioplastia com stent. A) Posicionamento do dispositivo de proteção embólica após transposição da placa ateromatosa; B) Pré-dilatação da estenose; C) Início da implantação do stent; D) Retirada do dispositivo de proteção embólica (modificado e autorizada a publicação de 34).....	30
Figura 6. Exemplo angiográfico de angioplastia com stent: A) Visão em perfil da lesão pré-angioplastia; B) Posicionamento do sten; C) Pós dilatação com balão coaxial do stent e D) Visão em perfil pós-angioplastia (Arquivo pessoal).....	30
Figura 7. Desenho esquemático da molécula de $Cr_2O_3$ (A) e $TiO_2$ (B) (modificado e autorizada a utilização por <a href="http://rruff.geo.arizona.edu/AMS/result.php">http://rruff.geo.arizona.edu/AMS/result.php</a> ).....	36
Figura 8. Desenho esquemático da corrosão galvânica e prótese de Nitinol, com a liberação de níquel iônico no plasma (44) .....	38
Figura 9. Imagens seriadas em microscopia eletrônica de varredura da transição de monócitos (A) para macrófagos (B) seguida pelo processo de fusão (C) para células gigantes (D) (Autorizado utilização por 57) .....	44
Figura 10. Desenho esquemático da transmigração e migração dos neutrófilos durante o processo, em decorrência da estimulação pelos produtos inflamatórios (Adaptado de 65).....	48

Figura 11. Microscopia eletrônica de transmissão de um neutrófilo ativado evidenciando seu núcleo multilobulado (N), a grande quantidade de mitocôndrias (m) e citoesqueleto (e), além de seus inúmeros grânulos (sg e pg) (publicação autorizada por 65).....	49
Figura 12. Desenho do estudo. Legendas: PCR: proteína C reativa; NBT: Nitro Blue Tetrazolium; PMA: 13-acetato de forbol éster 12-miristato.....	58
Figura 13. Configuração do fragmento de stent no interior do tubo de Eppendorf®. À esquerda o stent de Cobalto-Cromo (WallStent®) e à direita o stent de Nitinol (Protégé®) (arquivo pessoal).....	60
Figura 14. A) Colocação da amostra de sangue sobre o gradiente de Percoll®. B) Centrifugação da amostra no gradiente para realizar a separação. C) Aspecto após a separação: a primeira camada é constituída por plasma, plaquetas e demais leucócitos; a camada do meio é formada basicamente por neutrófilos e camada inferior, por eritrócitos. D) Coleta da camada de neutrófilos. E) Separação nos tubos para limpeza do Percoll® e hemólise. F) Pellet contendo neutrófilos (arquivo pessoal).....	62
Figura 15. A) Aferição em balança de precisão 0,02 µgrama de NBT para confecção da solução; B) Disposição dos tubos tipo Eppendorf® para realização da triplicata técnica (arquivo pessoal).....	63
Figura 16. A) e B) Câmara de Neubauer com campos de leitura; C) Perfil da câmara de Neubauer (arquivo pessoal).....	63
Figura 17. Espectrofotômetro UV-1800 ® (Shimadzu, Kyoto) utilizado no experimento (arquivo pessoal).....	65
Figura 18 Desenho esquemático da espectrofotometria (78).....	66
Figura 19 Redução do NBT em formazan por ação oxidativa das espécies reativas de oxigênio (77).....	66
Figura 20. Média dos valores de transmitância obtidos pela análise em espectrofotometria das amostras dos quatros grupos. Soluções com stent de CoCr e NiTi apresentaram maior produção de espécies reativas de oxigênio quando comparados com as soluções de controle negativa ( $p < 0,0001$ , com IC95% 0,0152 a 0,0320 e $p < 0,0001$ , com IC95% 0,0324 a 0,0835 para os stents de CoCr e NiTi, respectivamente). A soluções com stent de NiTi apresentaram maior produção de	

espécies reativas de oxigênio que a soluções com stent de CoCr ( $p = 0,002$  e IC95% 0,00052 a 0,0534).....71

Figura 21 Imagens de microscopia eletrônica de varredura: A) SC de NiTi com aumento de 23X; B) SC de NiTi com aumento de 200X, no qual se observa a secção transversal retangular da malha; C) SC de NiTi com aumento de 500X, no qual se observam neutrófilos aderidos à malha; D) SC de CoCr com aumento de 10X; E) SC de CoCr com aumento de 23X, no qual se observa a secção cilíndrica da malha; F) SC de CoCr com aumento de 500X, no qual se observa com melhor definição a secção transversal e a presença de neutrófilos aderidos à malha .....72

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais stents carotídeos comercialmente disponíveis e suas características (36).....	33
Tabela 2 – Comparação dos dados do módulo de Young e força tênsil das várias ligas metálicas (44).....	34
Tabela 3 – Potencial de repouso e potencial de quebra da camada de óxido das diversas ligas metálicas dos biomateriais (44).....	38
Tabela 4 – Gradiente de Percoll® montado para separação dos neutrófilos dos demais componentes sanguíneos. Legenda: HBSS - solução tampão de Hank.....	61
Tabela 5 – Leitura no espectrofotômetro em transmitância de todas as soluções das triplicatas técnicas estudadas (continua).....	68
Tabela 6 – Resultados obtidos na espectroscopia em transmitância com comprimento de onda de 550 nm e os valores laboratoriais de leucometria e proteína C reativa obtidos para cada amostra.....	70
Tabela 7 – Valores da análise estatística da comparação entre as amostras utilizando o teste t.....	72
Tabela 8 – Distribuição padrão dos elementos metálicos nas duas ligas estudadas (45).....	75

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Principais próteses utilizadas hoje em dia na prática médica e suas principais ligas metálicas constituintes (44).....	35
Quadro 2 – Exemplos de produtos inflamatórios já identificados como produtos de neutrófilos (65) (continua).....	53

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Artéria carótida
ACAS	Asymptomatic Carotid Atherosclerosis Study
ACC	Artéria carótida comum
ACE	Artéria carótida externa
ACI	Artéria carótida interna
ACST	Asymptomatic Carotid Surgery Trial
Al	Íon de alumínio
ANOVA	Análise de variância (estudo estatístico)
AS	Angioplastia de carótida com interposição de <i>Stent</i>
AVE	Acidente vascular encefálico
AVEi	Acidente vascular encefálico isquêmico
CAM	Molécula de adesão celular
CaRESS	Carotid Revascularization using Endarterectomy or Stenting Systems
CAVATAS	Carotid and Vertebral Artery Transluminal Angioplasty Study
Co	Íon de cobalto
CoCr	Cobalto-Cromo
Cr	Íon de cromo
Cr2O3	Óxido de cromo
CREST	Carotid Revascularization Endarterectomy versus Stenting Trial
EC	Endarterectomia carotídea
ECST	European Carotid Surgery Trial
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ESL-1	E-selectin-ligand 1
EVA-3S	Endarterectomy versus Angioplasty in Patients with Symptomatic Severe Carotid Stenosis
FasL	Ligante-Fas
FDA	Food and Drug Administration
Fe	Íon de ferro
fMLP	Formyl-methionine-leucine-phenylalanine
Fr	French
G-CSF	Fator de estimulação de colônias de granulócitos
GM-CSF	Fator de estimulação de colônias de granulócitos macrófagos
GPI	Proteínas de membrana integradas ao sistema G
H2O2	Peróxido de hidrogênio
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HBSS	Solução tampão de Hank
IL	Interleucina
IM	Infarto do miocárdio
JAM	Molécula de adesão juncional
LBQP	Laboratório de bioquímica e química de proteínas da UnB
LM	Liga metálica
LPS	Produtos da parede bacteriana
LTB4	Leucotrienos B4
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MMPs	Metaloproteinases de matriz
Mo	Íon de molibdênio
MPO	Mieloperoxidase

NaCl	Cloreto de sódio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fostato
NASCET	North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial
NBT	Nitro Blue Tetrazolium
Ni	Íon de níquel
NiTi	Nitinol
PAF	Fator ativador de plaquetas
PCR	Proteína C reativa
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PF4	Fator plaquetário 4
PMA	Acetato de forbol miristato
PQ	Potencial de quebra
PR	Potencial de repouso
PSGL-1	P-selectin glycoprotein ligand-1
RNA	Ácido ribonucleico
SAPPHIRE	Stenting and Angioplasty with Protection in Patients at High Risk for Endarterectomy
SC	Stent Carotídeo
Si	Íon de silício
SPACE	Stent-Supported Percutaneous Angioplasty of the Carotid Artery versus Endarterectomy
TGF- $\beta$	Fator de crescimento transformador beta
Ti	Íon de titânio
TiO <sub>2</sub>	Óxido de titânio
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
UnB	Universidade de Brasília
Zn	Íon de zinco
Zr	Íon de zircônio

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	17
1.1 DOENÇA ATEROMATOSA CAROTÍDEA .....	17
<b>1.1.1 Epidemiologia</b> .....	17
<b>1.1.2 Etiopatogenia</b> .....	18
1.2 TRATAMENTOS CIRÚRGICOS DA DOENÇA ATEROMATOSA CAROTÍDEA .....	20
<b>1.2.1 Endarterectomia carotídea</b> .....	23
<b>1.2.2 Angioplastia percutânea</b> .....	26
1.3 STENTS CAROTÍDEOS.....	31
<b>1.3.1 Caracterização dos stents</b> .....	31
<b>1.3.2 Características das ligas metálicas: biofuncionalidade e biocompatibilidade</b> .....	33
<b>1.3.3 Re-estenose neo-intimal</b> .....	39
1.4 REAÇÃO TIPO CORPO ESTRANHO DOS STENTS CAROTÍDEOS.....	41
1.5 NEUTRÓFILOS E REAÇÃO TIPO CORPO ESTRANHO .....	44
<b>1.5.1 Função executora</b> .....	45
<b>1.5.2 Função reguladora</b> .....	52
<b>1.5.3 Limitação da resposta inflamatória</b> .....	55
<b>2 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS</b> .....	57
2.1 OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS.....	57
<b>3. MÉTODO</b> .....	58
3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....	58
3.2 POPULAÇÃO DE ESTUDO.....	59
3.3 PREPARAÇÃO DOS STENTS CAROTÍDEOS.....	59



3.4 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS.....	60
3.5 ANÁLISE FISIOLÓGICA DOS NEUTRÓFILOS.....	64
3.6 ANÁLISE ESTRUTURAL DOS STENTS.....	67
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA E CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	67
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>68</b>
4.1 AFERIÇÃO DE PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO POR ESPECTROFOTOMETRIA ÓPTICA.....	68
4.2 ANÁLISE ESTRUTURAL EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	72
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>73</b>
5.1 RESISTÊNCIA À CORROSÃO.....	73
5.2 LIBERAÇÃO IÔNICA.....	75
5.3 ANÁLISE ESTRUTURAL DAS LIGAS.....	79
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>80</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>81</b>
<b>ANEXO A – ARTIGO ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO.....</b>	<b>90</b>
<b>ANEXO B – CERTIFICADO DE ENVIO PARA PARA PUBLICAÇÃO.....</b>	<b>105</b>
<b>ANEXO C – APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA.....</b>	<b>106</b>

# **1 INTRODUÇÃO**

## **1.1 DOENÇA ATEROMATOSA CAROTÍDEA**

A doença oclusiva da artéria carótida, também chamada de ateromatose da artéria carótida, refere-se ao estreitamento das artérias carótidas, decorrente geralmente do acúmulo de substâncias lipídicas e depósitos de colesterol, chamados de placas ateromatosas (1-6).

### **1.1.1 Epidemiologia**

As doenças cardiovasculares são a principal causa de óbito no Brasil, segundo dados do DATA-SUS. Dentre essas doenças, destacam-se os acidentes vasculares encefálicos isquêmicos (AVEi) agudos, tanto em virtude de sua progressiva incidência quanto em razão da morbidade nos casos não fatais (7). Nos países ocidentais, o AVEi representa a terceira maior causa de morte e é a principal causa de incapacidade permanente ajustado por idade (2,3,5). Todo ano, cerca de 700 mil pessoas são acometidas por AVEi nos Estados Unidos e acredita-se que este número deve crescer devido ao envelhecimento e às mudanças na distribuição étnica da população (3,5).

Estima-se que um quarto dos AVEi estão relacionados à doença ateromatosa oclusiva da artéria carótida interna no segmento cervical (2,3). De acordo com estudos populacionais, a incidência de estenose carotídea aumenta com a idade: de 0,2% em homens com menos de 50 anos para 7,5% em homens octogenários; nas mulheres, a incidência de estenose moderada da carótida varia de 0% a 5% (3).

### 1.1.2 Etiopatogenia

A aterosclerose arterial representa o desfecho final de um processo inflamatório iniciado na camada intimal, que progressivamente leva à diminuição da luz arterial (6,8,9).

Uma cascata de eventos iniciada com a deposição de material lipídico, a ativação inflamatória e a proliferação da camada muscular estão envolvidos na formação e progressão da placa aterosclerótica (2,9,10). Os eventos se iniciam com uma lesão da camada intimal, que geralmente ocorre nos locais de maior estresse hemodinâmico (4). Assim, a maior parte das doenças oclusivas da carótida ocorre em sua bifurcação, que apresenta configuração anatômica única, o bulbo carotídeo, em que a área dos vasos na bifurcação aumenta ao invés de diminuir (4). Essa mudança de calibre, em conjunto com a divisão de fluxo na bifurcação carotídea, cria um padrão turbulento de fluxo e áreas de tensão de cisalhamento variável ao longo das paredes das artérias carótidas (4). As placas carotídeas são frequentemente encontradas ao longo da parede exterior da artéria carótida interna, oposta à bifurcação do fluxo, o que corresponde a uma área de baixa tensão de cisalhamento (Figura 1) (2,4,5).

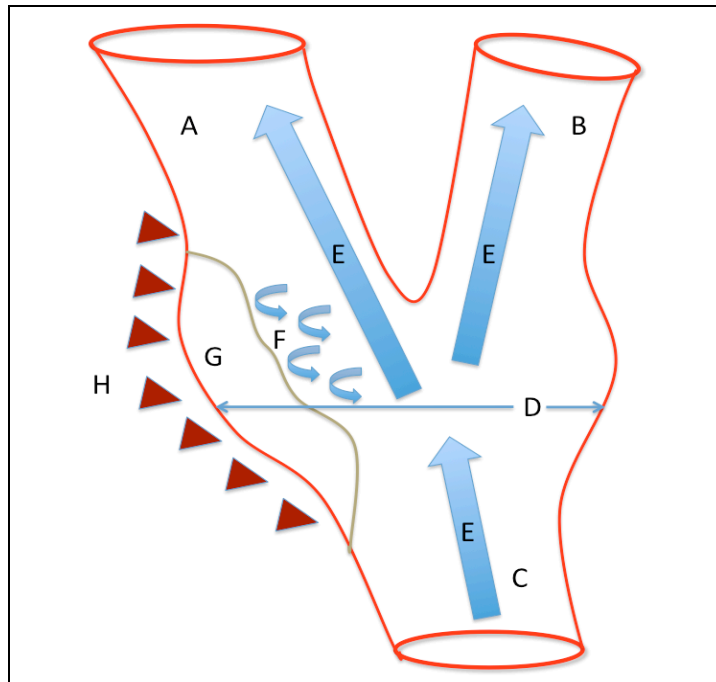


Figura 1. Dinâmica do fluxo na bifurcação carotídea: A) Artéria Carótida Interna; B) Artéria Carótida Externa; C) Artéria Carótida Comum; D) Bulbo Carotídeo; E) Fluxo laminar intra-arterial; F) Fluxo turbilhonado pelo stress hemodinâmico e menor força de cisalhamento; G) Placa ateromatosa; H) Parede externa da Artéria Carótida Interna – local de maior deposição de material lipídico (Arquivo pessoal)

Posteriormente, ocorre a migração de células inflamatórias para o local da lesão, formando um tecido cicatricial fibrótico rico em lipídios fagocitados pelos monócitos e macrófagos (2,9,10). A produção de produtos inflamatórios, como as espécies reativas de oxigênio, nesse tecido cicatricial é a responsável pela progressão da placa e risco de ruptura (2, 8, 9,10). Como principais fatores facilitadores da lesão endotelial, podemos citar a hipertensão arterial sistêmica (HAS), tabagismo, etilismo crônico e hiperhomocisteinemia (2, 3, 5).

As placas geralmente passam a ser sintomáticas quando ocorre hemorragia intraplaca, formação de trombos e ulceração. A maioria das rupturas das placas ocorre no ponto médio da superfície da placa (6, 8).

## 1.2 TRATAMENTOS CIRÚRGICOS DA DOENÇA ATEROMATOSA CAROTÍDEA

Atualmente são aceitos dois tipos de intervenção terapêutica na doença ateromatosa carotídea: a endarterectomia de carótida (EC) e angioplastia percutânea com interposição de stent (AS) (11-19).

O benefício da EC na redução do risco de acidente vascular encefálico em pacientes sintomáticos (história de AVEi prévio ou de acidentes isquêmicos transitórios) com estenose da carótida moderada (> 50 %) ou assintomáticos com estenose grave (> 60%) foi demonstrado em vários ensaios randomizados, como o *North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial* (NASCET), o *Asymptomatic Carotid Atherosclerosis Study* (ACAS), o *Asymptomatic Carotid Surgery Trial* (ACST) e o *European Carotid Surgery Trial* (ECST) (11-17). Nas últimas décadas, estudos têm demonstrado que benefícios e taxas de complicação semelhantes podem também ser atribuídos à AS (16, 20, 21, 22).

O estudo *Carotid and Vertebral Artery Transluminal Angioplasty Study* (CAVATAS), iniciado em 1992 e concluído em 1997, apresenta a primeira comparação randomizada entre o tratamento endovascular e o procedimento cirúrgico em pacientes com estenose carotídea (22). Esse estudo foi concebido para comparar a angioplastia com balão, com ou sem colocação de stent e sem o uso de dispositivos de proteção embólica, com a EC (22). Os resultados foram essencialmente equivalentes entre a angioplastia e grupos da EC no que diz respeito à taxa de acidente vascular encefálico incapacitante ou morte em 30 dias pós-procedimento (6,4% versus 5,9%, respectivamente). Não foram encontradas diferenças significantes na taxa de AVEi ipsilateral com análise de sobrevivência de até três anos após a randomização (22). A taxa de re-estenose grave (70 a 99% da luz) documentada por ultrassom um ano após o tratamento foi de 14% no grupo da angioplastia e de 4% no grupo de tratamento cirúrgico. Os pacientes do grupo cirúrgico tiveram maior incidência de paralisia dos nervos cranianos e de hematoma no pescoço (22).

O estudo *WallStents* foi um ensaio multicêntrico para evidenciar a equivalência de EC e AS, no qual 209 pacientes sintomáticos com 60% a 99% de estenose foram inscritos (16, 23, 24). A taxa de complicação (qualquer acidente vascular encefálico ou morte) após 30 dias do procedimento ocorreu em 12,1% do

grupo de stent da AC e 4,5% do grupo de EC. O AVE ipsilateral e morte relacionados ao procedimento em um ano ocorreram em 12,1% dos pacientes randomizados para implante de stent e em 3,6% daqueles randomizados para endarterectomia. As taxas de AVE isoladamente foram de 3,7% para a AS e 0,9% para EC. O estudo foi interrompido antes da conclusão, devido à inferioridade da angioplastia (23, 24).

A realidade da angioplastia com stent começou a mudar com a introdução dos dispositivos de proteção embólica (25, 26). A embolização cerebral de material ateromatoso friável do arco aórtico e da AC durante a colocação de stent poderia gerar micro-infartos e consequentes déficits neurológicos (16, 23, 25, 26). Foram desenvolvidos três tipos de dispositivos de proteção embólica: aqueles que bloqueiam o fluxo anterógrado da artéria carótida interna (ACI), aqueles que realizam a reversão do fluxo na ACI e os filtros de proteção embólica distal (16, 23, 25, 26). Nos Estados Unidos, apenas os filtros de proteção distal são aprovados para uso pela *Food and Drug Administration* (FDA) (27).

O estudo *Endarterectomy versus Angioplasty in Patients with Symptomatic Severe Carotid Stenosis* - EVA-3S foi um trabalho francês multicêntrico desenvolvido para comparar a eficácia da AS com ou sem proteção embólica e a EC na prevenção secundária de acidente vascular encefálico isquêmico (28, 29). O estudo foi interrompido porque AS sem o dispositivo de proteção esteve associada a uma excessiva taxa de AVE ou morte em 30 dias (28, 29). O estudo foi então redesenhado para comparação da AS com filtro de proteção com EC (28, 29). A incidência de AVE ou morte em 30 dias foi de 3,9 % após EC contra 9,6% após implante de stent; em seis meses, foi de 6,1% e 11,7 % respectivamente (28, 29). A lesão de nervo craniano foi mais comum após EC do que após implante de stent (28). Comparando a taxa de 9,6% de AVE ou morte com o grupo da EC (3,9%), o risco relativo se torna 2,05, mas com intervalo de confiança de 95% de 0,97-4,36, o que não é estatisticamente significativo (28, 29). Já tava de restenose foi 12,5% para AS e 5% para EC (28).

O estudo *Carotid Revascularization using Endarterectomy or Stenting Systems* - *CaRESS* foi um trabalho multicêntrico, não-randomizado, prospectivo, que comparou a AS com dispositivo de proteção e EC (30). A escolha terapêutica ficou a cargo do médico assistente. Foram eleitos para o tratamento pacientes sintomáticos com mais de 50% de estenose e pacientes assintomáticos com mais de 75% de

estenose. Os resultados, mimetizando o cenário do "mundo real", do estudo *CaRESS* evidenciaram que AS apresentaram tendência de menor morbidade e mortalidade quando comparados a EC, com valores semelhantes aos alcançados no *North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial (NASCET)* (30).

O *Carotid Revascularization Endarterectomy Versus Stenting Trial (CREST)* foi um estudo randomizado que compara a eficácia da EC e da AS com proteção embólica, comparando a incidência de AVEi, infarto do miocárdio (IM) e morte em doentes sintomáticos com mais de 50% de estenose da AC e pacientes assintomáticos com mais de 70% de estenose (13, 14). Vários centros na América do Norte corroboram com o estudo, com o objetivo de incluir 2.500 pacientes. Para a seleção dos intervencionistas, foi exigida experiência anterior em AS acima de 20 procedimentos utilizando o stent ACCULINK® e o sistema de proteção embólica ACCULINK® (13, 14). As taxas de eventos adversos foram de 6,2% para AS e 5,6% para EC e de restenose de 6,0% para AS e 6,3% para EC (13, 14).

O objetivo do estudo randomizado intitulado *Stenting and Angioplasty with Protection in Patients at High Risk for Endarterectomy – SAPHIRE* foi comparar AS com EC e demonstrar estatisticamente a não inferioridade do implante de stent em relação ao EC (31). A população do estudo consistia em pacientes com estenose sintomática maior ou igual a 50%, ou estenose assintomática maior ou igual a 80%. O grupo de AS utilizou dispositivo de proteção embólica. Foram estudados 747 pacientes, dos quais 344 foram submetidos à randomização (31). Foram avaliados incidência de morte, AVEi e infarto do miocárdio (IM) dentro de 30 dias e morte ou AVE ipsilateral entre 31 dias e 1 ano. Além disso, também foram avaliadas a re-estenose em um ano, a paralisia de nervos cranianos e complicações no sítio cirúrgico ou no local de punção (31). Os resultados evidenciaram que, em um ano, 12,2% dos pacientes submetidos a AS apresentaram morte, AVEi ou IM, contra 20,1% do grupo de EC ( $p = 0,004$ ) (31). A re-estenose da AC ocorreu em 4,3% do grupo de EC contra 0,6% do grupo de AS ( $p = 0,04$ ) (31). Os resultados do grupo de AS foram melhores que os do grupo de EC para a ocorrência de IM (2,5% stent versus 8,1% EC,  $p=0,03$ ) e AVE ipsilateral (0% no stent versus 3,5% no EC,  $p=0,02$ ) (31).

Dados de três anos de acompanhamento do SAPHIRE apresentaram taxa global de morte, AVEi e IM no geral (30,3% EC vs 25,5% AS,  $p = 0,20$ ) e incidência de morte isolada (24,2% EC vs 20,0% AS,  $p = 0,280$ ), AVE ipsilateral isolado (7,1%

EC vs 6,7% AS,  $p = 0,945$ ) e re-estenose da AC (7,1% EC vs 3,0% AS,  $p = 0,084$ ), todos a favor do stent da AS sobre EC, porém sem relevância estatística (31).

Para comparar a segurança e eficácia entre EC e AS no tratamento profilático do AVEi em pacientes com estenose sintomática da AC, o Ministério Alemão de Ciência patrocinou o *Stent-Supported Percutaneous Angioplasty of the Carotid Artery versus Endarterectomy (SPACE)*, um estudo prospectivo, multicêntrico e randomizado (32). Um total de 1.200 pacientes foi randomizado para AS ( $n=605$ ) e EC ( $n=595$ ). Foi aferida a incidência em 30 dias de AVE ipsilateral ou morte (32). A taxa de morte ou AVE isquêmico ipsilateral a partir do momento da randomização até 30 dias após o procedimento foi de 6,84% com AS e 6,34% com a EC (32).

Dessa forma, tanto a endarterectomia (EC) quanto a angioplastia percutânea com interposição de stent (AS) mostram resultados satisfatórios com redução dos índices de morbimortalidade se comparados ao tratamento clínico, sobretudo em pacientes sintomáticos com estenose maior que 50% (11-32).

### **1.2.1 Endarterectomia carotídea**

A EC é um procedimento cirúrgico aberto, realizado com o paciente sob anestesia geral, cujo objetivo é a retirada da placa aterosclerótica obstrutiva do lúmen da AC (12).

O procedimento se inicia com a incisão cervical feita paralela e anterior ao músculo esternocleidomastóideo e centrada sobre a bifurcação carotídea. A dissecação é realizada através do platísmo e o músculo esternocleidomastóideo é afastado lateralmente por afastadores auto-estáticos (12).

A veia jugular interna é visualizada e a bainha carotídea é aberta ao longo da borda anterior da veia (12). A veia jugular interna é retraída lateralmente e a veia facial comum é ligada. A dissecação se mantém anterior à artéria carótida comum para evitar lesão do nervo vago (12). O nervo vago geralmente se encontra numa posição lateral posterior no interior da bainha carotídea (12).

Deve ser dada atenção aos nervos cranianos IX (nervo glossofaríngeo), X (nervo vago), XI (nervo acessório), XII (nervo hipoglosso), ramo mandibular marginal do VII (nervo facial) e nervo laríngeo recorrente (12). O nervo laríngeo recorrente



pode cruzar anteriormente à artéria carótida e pode ser confundido com uma parte da alça cervical; se ele for lesionado inadvertidamente, resulta em paralisia das cordas vocais ipsilateral (12).

A dissecação continua ascendentemente para isolar a artéria carótida externa (ACE). A artéria carótida interna (ACI) é exposta até um ponto onde o aspecto está completamente normal (Figura 2) (12).

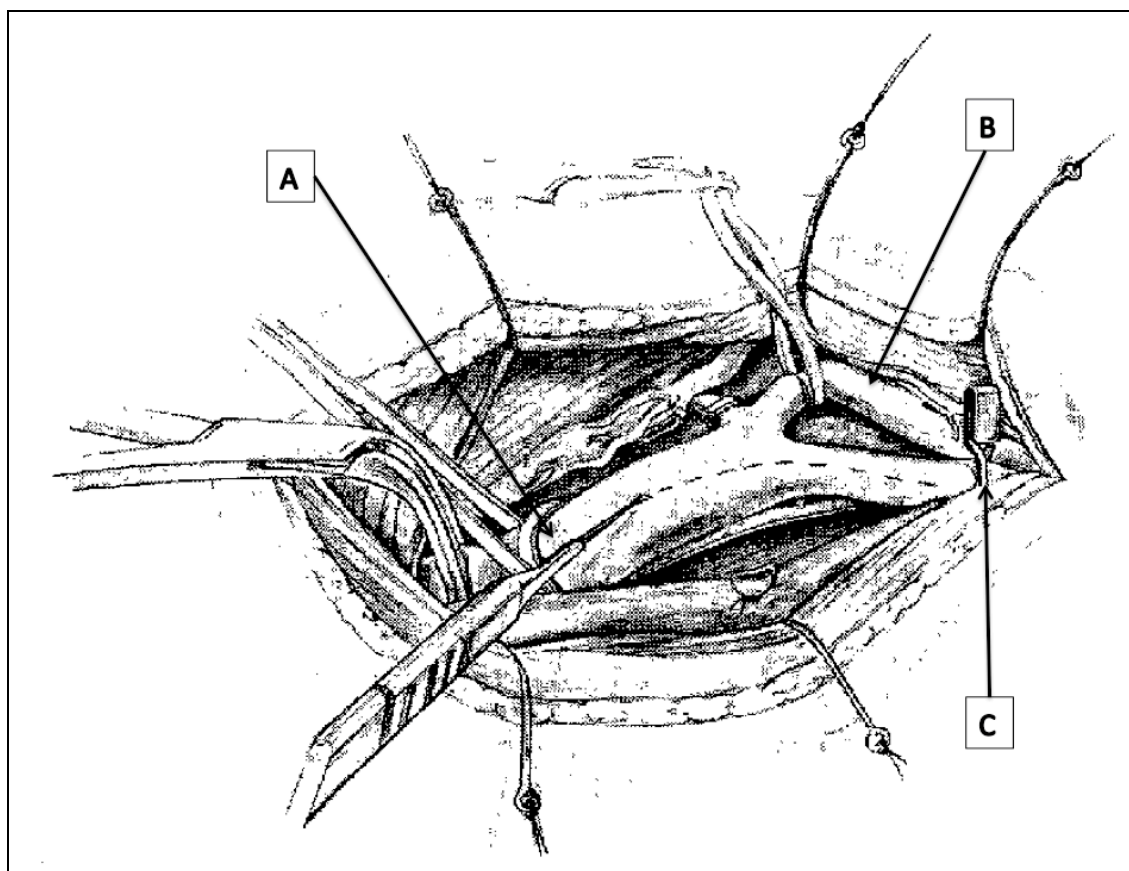


Figura 2. Exposição e clampeamento da Artéria Carótida Comum (A), da Artéria Carótida Externa (B) e da Artéria Carótida Interna (C). O tracejado evidencia o incisão da arteriotomia (modificado e autorizado utilização por 12)

O controle proximal da artéria carótida comum (ACC) é obtido ao nível de estenose, circundando a artéria com uma fita umbilical. Uma vez que o controle proximal é obtido, a dissecação continua distalmente ao redor da ACE até seu primeiro ramo, a artéria tireóidea superior. Posteriormente, o controle é obtido distal na artéria carótida interna (12).

A dissecação deve ser feita com extremo cuidado para não lesar os nervos adjacentes, principalmente os nervos vago e hipoglosso, e evitar liberação de êmbolos (12).

A heparina (5000-7000 U) é administrada por via intravenosa. A ACI, a ACC, e a ACE são obstruídas, nessa ordem. É feita uma arteriotomia com uma lâmina nº 11, da ACC, previamente à lesão, até a ACI, após a lesão (12).

A placa ateromatosa é dissecada com dissecador de Penfield, sendo a ressecção ideal quando a remoção da placa ocorre entre as camadas endotelial e média (Figura 3) (12).

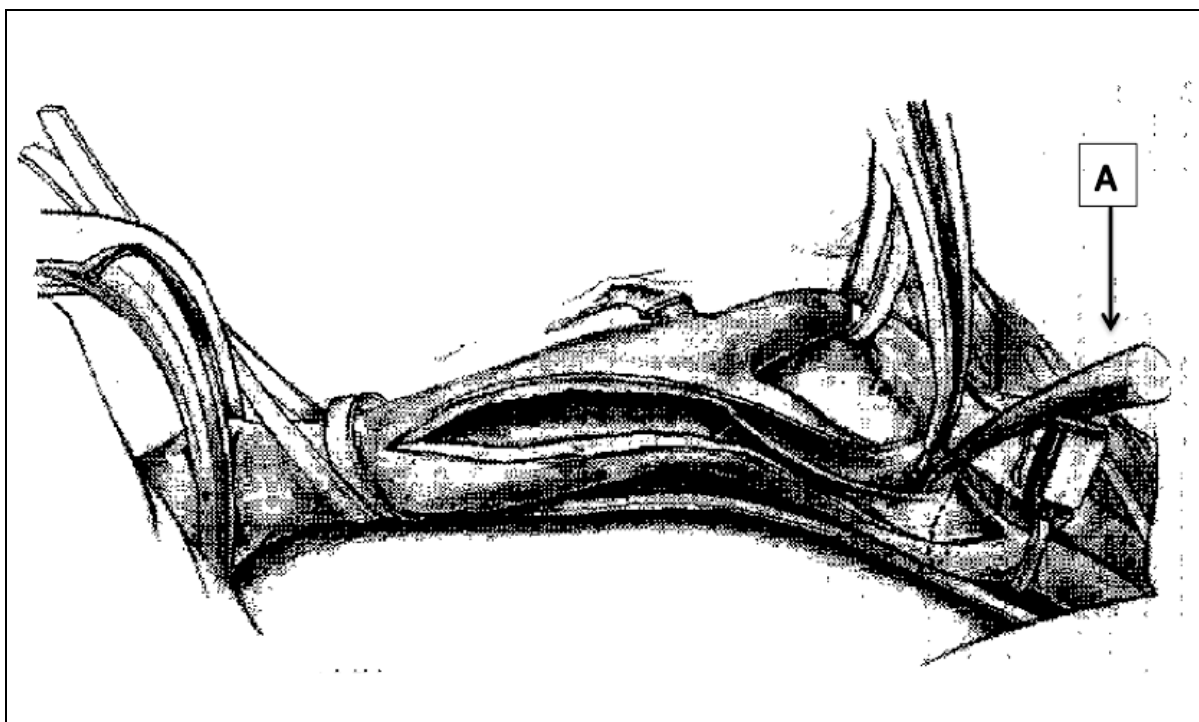


Figura 3. Arteriotomia e retirada da placa ateromatosa com o dissecador de Penfield (A) (modificado e autorizado utilização por 12)

Após a remoção da placa, todos os debris residuais e fibras da camada média são retirados por causa de sua potencial contribuição para a embolização ou restenose por hiperplasia endotelial. A superfície da endarterectomia é irrigada com solução salina heparinizada para facilitar a visualização e remoção de todos os debris (12). Antes que as fitas sejam retiradas, a lavagem deve ser feita a partir de cada direção de fluxo bloqueado (12).

Como regra geral, as artérias são fechadas com um *patch* (expansor) e a ferida é fechada por planos (12).

Embora a EC seja um dos procedimentos cirúrgicos mais realizados atualmente e os benefícios sejam bem estabelecidos na literatura, muitos pacientes não podem ser submetidos com segurança a uma intervenção tão agressiva, devido a fatores técnicos ou anatômicos ou a doenças clínicas graves subjacentes, como doença arterial coronariana e insuficiência cardíaca (12).

Na análise dos resultados do NASCET, a probabilidade de a EC estar associada a complicações médicas foi de aproximadamente 1,5 vez maior em pacientes com história prévia de infarto do miocárdio, angina ou hipertensão (12, 14, 15, 16, 26). Além disso, os benefícios da cirurgia da EC quando comparado ao tratamento conservador mostrados pela NASCET, pelo ACAS, pelo ACST e pelo ECST são perdidos se a taxa de AVEi ou morte exceder 6% para pacientes com estenose carotídea sintomática, ou 3% para aqueles com estenose carotídea assintomática em 30 dias de pós-operatório (12, 14, 15, 16, 26).

### **1.2.2 Angioplastia percutânea**

A angioplastia percutânea da carótida com interposição de stent (AS) é um procedimento realizado integralmente por via endovascular, com o objetivo de recuperação da luz arterial sem remoção da placa aterosclerótica (33, 34). O procedimento ganhou espaço inicialmente para tratamento de pacientes de risco proibitivo para EC, passando então por natural processo evolutivo, tendo sido modificado de acordo com a experiência dos operadores e com o desenvolvimento de novos dispositivos (33, 34). Um dos maiores benefícios da AS ainda reside na rápida recuperação do paciente, que retorna quase imediatamente às suas atividades diárias após curto período de internação (33, 34).

A sequência normal do procedimento realizado em conjunto com a utilização de dispositivo de filtro para a proteção embólica é descrita a seguir (33).

O procedimento é realizado em uma sala de angiografia com recursos de imagem com subtração digital e fluoroscopia (Figura 4) (33). O paciente permanece sedado, mas ainda desperto para avaliação neurológica. É aconselhável a

realização de cateterismo vesical de demora e de dois acessos venosos periféricos (33). A pressão arterial, a saturação de oxigênio e o ritmo cardíaco são monitorados durante o procedimento. A AC é geralmente abordada por via percutânea, através da artéria femoral comum, mas em alguns casos mais graves, também pode ser necessária a abordagem pelas artérias radial e braquial (33).



Figura 4. Sala de angiografia com um aparelho monopiano (Arquivo pessoal)

Uma angiografia do arco aórtico é inicialmente realizada para definir a gravidade da doença aterosclerótica, bem como a configuração anatômica dos grandes vasos. Isso permite que o operador possa prever a possibilidade de cateterização da carótida e selecionar as dimensões dos dispositivos necessários para o procedimento (33). A angiografia seletiva da artéria carótida comum é então realizada e a gravidade da estenose é definida (33). Os diâmetros da artéria carótida comum (ACC) e ACI são medidos, com especial atenção à determinação do local de deposição dos dispositivos de proteção embólica (33). A angiografia intracraniana também é essencial antes da intervenção, pois a presença de lesões intracranianas deve ser avaliada para abordagem em conjunto (33).

Os pacientes são previamente submetidos a terapia antiplaquetária e, durante o procedimento, é administrada heparina (10 a 20 unidades por quilograma), com intuito de prevenir a formação de trombos após a lesão endotelial pela implantação do stent (33). A dose intravenosa de heparina é administrada após a cateterização do ACC e tem o objetivo de manter o tempo de coagulação ativada de 250 a 300 segundos durante todo o procedimento. A infusão de heparina é geralmente interrompida no fim do processo (33).

Ocasionalmente pode ocorrer bradicardia durante a angioplastia. Dessa forma, atropina e vasopressores devem estar prontamente disponíveis caso o paciente desenvolva bradicardia e hipotensão (33). O monitoramento contínuo da frequência cardíaca, da pressão arterial e do *status* neurológico do paciente durante o procedimento é essencial (33).

Um fio de 0,035 polegada de diâmetro é posicionado no ACE. O cateter diagnóstico é trocado sobre o fio por outro cateter portador de 9 a 10 French (Fr), que é então posicionado na ACC abaixo da bifurcação. A seguir, a lesão é transposta com o dispositivo de proteção (33). Em alguns casos mais graves, pode-se optar por realizar a pré-dilatação do segmento estenótico com cateter balão de angioplastia coaxial de 3 a 4 mm antes da implantação do stent. Esse deve ser avançado através da lesão ao longo de um microguia de 0,014 polegada. Em raras ocasiões, a pré-dilatação deve ser realizada antes da introdução de um dispositivo de proteção embólico (33).

O diâmetro do stent deverá ser dimensionado para se acomodar no maior segmento da AC, que deverá ser coberto (geralmente entre 1 e 2 mm maior do que o calibre normal da ACC) (33). Apesar de algumas evidências associadas à restenose tardia, o superdimensionamento do stent na ACI geralmente não resulta em eventos adversos, mas uma prótese em cone pode conformar-se melhor à parede do vaso, nos casos em que haja discrepância importante entre a ACC e ACI (33). Deve-se dar atenção especial na seleção do stent, que deve ter o tamanho compatível para cobrir toda a extensão da placa ateromatosa (33).

Após a liberação do stent, deve-se dilatar a malha do stent utilizando um balão com diâmetro correspondente ao do ACI distal ao stent. Geralmente se utiliza um balão coaxial para esse fim (33). O dispositivo de proteção embólico é então removido com um cateter de recuperação (figura 5 e 6) (33, 34).

Uma boa hidratação deve ser mantida após o procedimento. A hipotensão e hipertensão devem ser evitadas (33). Particular atenção deve ser dada em casos de estenose grave e oclusão contralateral, pelo risco da síndrome de reperfusão, com risco de hemorragias intracranianas catastróficas (33). O introdutor femoral deve ser removido quando o tempo de coagulação ativada for inferior a 150 segundos (33). O paciente geralmente recebe alta na manhã seguinte. O seguimento para avaliar a patência da artéria tratada pode ser feito por meio de ultrassonografia, obtida antes da alta, após seis meses, um ano e, em seguida, anualmente (33). O regime antiplaquetário da aspirina e clopidogrel é mantido durante 8 a 12 semanas após o procedimento, após isso, os pacientes permanecem sob terapia somente de aspirina (33).

Alguns fatores podem aumentar o índice de complicação do procedimento, como a anatomia desfavorável e as características da lesão (33). Artérias ilíacas ou aorta abdominal estenótica ou ocluída estão entre as características de acesso desfavoráveis (33). Um arco difícil (tipo 2 ou 3, calcificação ou tipo bovino) pode ser um desafio para o cirurgião menos experiente (33). A oclusão da ACE ou o envolvendo da ACC pela estenose pode aumentar os riscos no ato de posicionar o cateter de guia ou portador. Tortuosidade da ACI, gravidade da lesão, grau de calcificação e presença de trombo intraluminal representam outros fatores adversos (33).

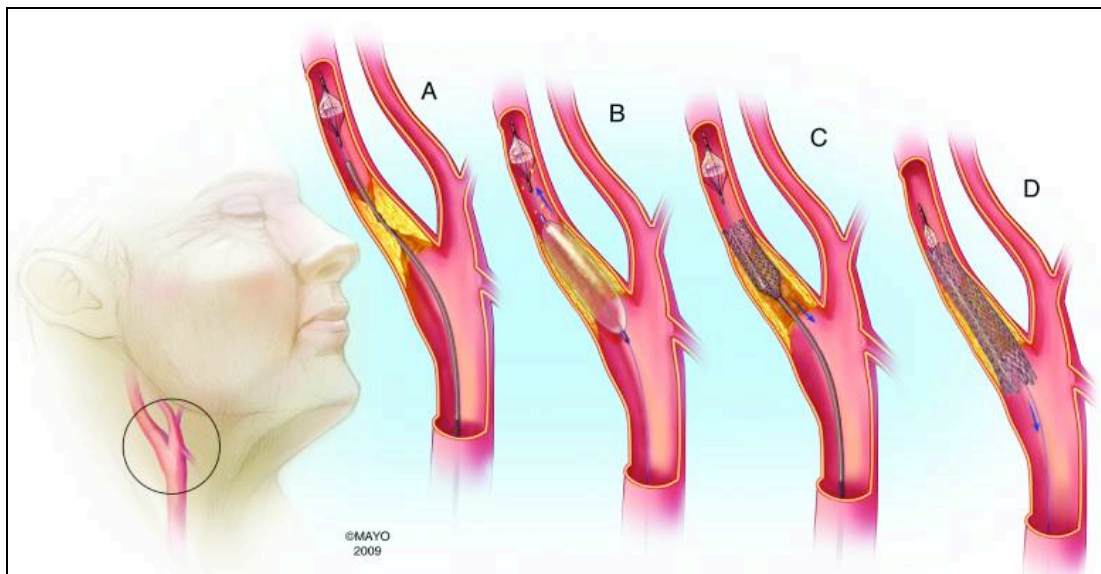


Figura 5. Desenho esquemático do processo de angioplastia com stent. A) Posicionamento do dispositivo de proteção embólica após transposição da placa ateromatosa; B) Pré-dilatação da estenose; C) Início da implantação do stent; D) Retirada do dispositivo de proteção embólica (modificado e autorizada a publicação de 34)

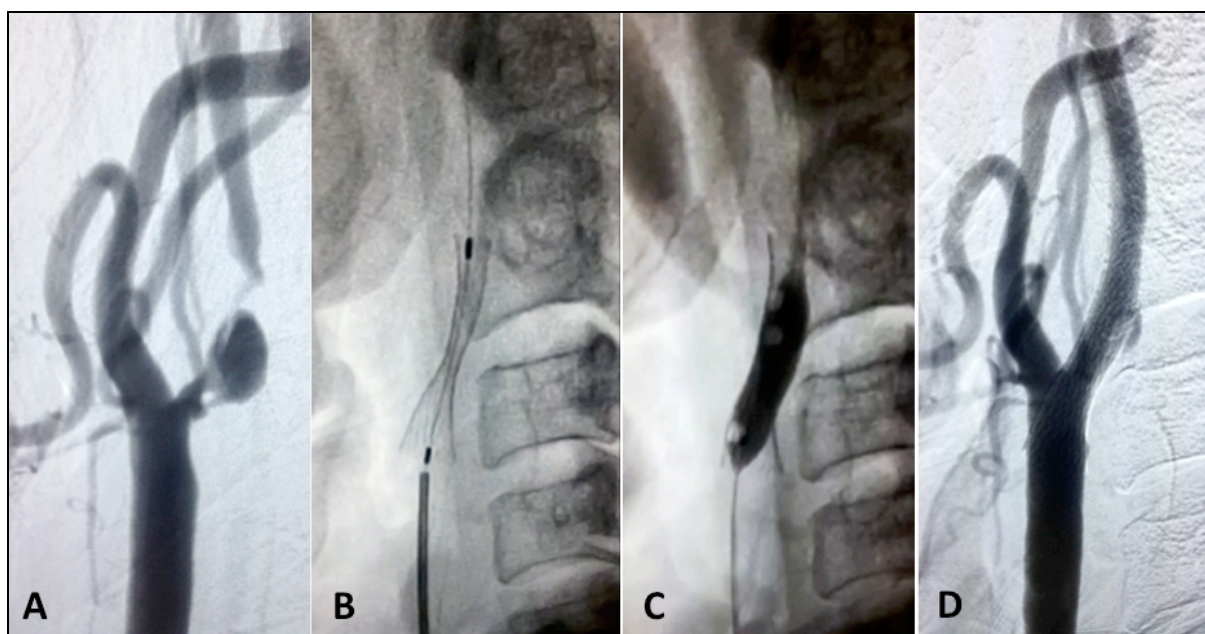


Figura 6. Exemplo angiográfico de angioplastia com stent: A) Visão em perfil da lesão pré-angioplastia; B) Posicionamento do stent; C) Pós dilatação com balão co-axial do stent e D) Visão em perfil pós-angioplastia (Arquivo pessoal)

Dentre as principais complicações ocorridas durante o procedimento, podemos destacar: dissecções arteriais, microembolias distais com acidente vascular encefálico, pseudoaneurismas, fístulas arteriovenosas, perfuração arterial, hemorragias, síndrome de hiperperfusão e vasoespasmos graves (33).

Complicações neurológicas isquêmicas ou hemorrágicas podem ocorrer durante todo o procedimento (33). Se um doente desenvolver súbita mudança neurológica, deverá ser submetido a intubação orotraqueal e hemorragias intracranianas devem ser descartadas, por meio da realização da tomografia computadorizada de crânio (33). As complicações vasculares intracranianas da AS podem ser agrupados em oclusão do vasos grandes, chuva de êmbolos e hemorragia. Se a obstrução de um grande vaso for identificada, deve ser tentada imediatamente a recanalização química ou mecânica (33). Se for identificada hemorragia, a heparinização deve ser revertida com a protamina, a pressão arterial deve ser bem controlada e tomografias computadorizadas de crânio seriadas devem ser realizadas com 6 e 12 horas após o evento. Deve ser considerada a abordagem cirúrgica para hematomas com risco de vida (33). Complicações sistêmicas também podem ocorrer após AS. Elas incluem convulsões, IM e nefropatia por contraste (33).

Além disso, em médio prazo, a maior complicação inerente ao procedimento é a re-estenose por proliferação neo-intimal no stent (33). A re-estenose possui incidência média de 4,8% em 2 anos, tendo como principal fator desencadeador a resposta inflamatória à lesão intimal no momento da implantação do stent e à resposta inflamatória tipo corpo estranho desencadeada pela malha metálica (33).

### 1.3 STENTS CAROTÍDEOS

Os stents carotídeos são estruturas metálicas tubulares auto-expansíveis de alta força radial, não reabsorvíveis, sem revestimento medicamentoso, com paredes fenestradas, que têm como objetivo a manutenção do lúmen vascular pérvio (35).

#### 1.3.1 Caracterização dos stents

As fenestrações da parede configuradas pelo trançado da malha pode resultar em espaços diminutos, o que é conhecido como malha fechada; espaços mais amplos, chamados de malha aberta; ou ainda com conformação híbrida entre as



duas características (36, 37). A real diferença clínica e prática entre os tipos de malha ainda é motivo de discussão, mas acredita-se que stents de malha fechada desprendem menor quantidade de êmbolos à sua implantação, porém apresentam menor flexibilidade e navegabilidade pelas tortuosidades dos vasos (36-40).

Os stents de malha fechada apresentam pontes de ligação entre cada seguimento da malha, diminuindo o espaço entre os trançados de sua malha (36). Já os stents de célula aberta apresentam nenhuma ou poucas pontes de ligação entre os seguimentos, o que, conseqüentemente, aumenta as janelas do trançado e aumenta a flexibilidade e navegabilidade do stent (36) Os stents híbridos são próteses constituídas de segmentos proximal e distal formados por células abertas para maximizar a acomodação nas tortuosidades vasculares, em combinação com um segmento de célula fechada central de placa, para adequada cobertura de trombos (36, 37, 39.40).

Como exemplo de stents de malha aberta, podemos citar:

- PRECISE ® PRO RX ® (Cordis Corporation)
- Protégé ® RX Carotid Stent System (ev3)
- RX Acculink ® Carotid Stent System (Abbott)
- Sinus Stents ® (Optimed)
- Zilver 518 ® RX (Cook Medical)

Seguem exemplos de malha híbrida:

- Cristallo Ideale ® (Invatec)
- Sinus-carotid ® RX (Optimed)

Seguem exemplos de malha fechada:

- Carotid WALLSTENT ® Monorail ® (Boston Scientific)
- Xact ® Carotid Stent System (Abbott)

A tabela 1 resume as principais características de alguns stents disponíveis no mercado (36).

Tabela 1 – Principais stents carotídeos comercialmente disponíveis e suas características (36)

Stent/ Fabricante	Arquite- tura	Confor- mação	Cateter portador compatí- vel	Perfil (mm)	Fio-guia compatí- vel (in)	Diâme- tro (mm)	Comp. (mm)	Área da malha aberta (mm <sup>2</sup> )
Carotid Wallstent Boston Scientific	Malha fechada	Cilíndrico	5F:6.8mm 6F:10mm	1.67 1.97	0.014	135	30, 40, 50	1.08
Precise Rx Cordis	Malha aberta	Cilíndrico	5.5F-5.8 mm 6F:9 a 10mm	1.85 2.00	0.014 a 0.018	135	20, 30, 40	5.89
Protégé EV3	Malha aberta	Cilíndrico Cilíndrico	6F	1.98	0.014	135	20, 30, 40, 60 30, 40	10.71
Rx Acculink Abbott	Malha aberta	Cilíndrico Cônico	6F	1.98	0.014	126	20, 30, 40 30, 40	11.48
XACT Abbott	Malha fechada	Cilíndrico Cônico	6F	1.68	0.014	136	20, 30 30, 40	2.74
Zilver 5 1 8 Cook	Malha aberta	Cilíndrico	5F	1.67	0.014 a 0.018	125	20, 30, 40, 60, 80	12.76

De uma forma geral, os SC utilizados são compostos apenas por duas ligas metálicas distintas: cobalto-cromo (CoCr) (WallStent®, como representante único) e a liga de níquel e titânio, conhecida como Nitinol (NiTi) (36).

Outra característica importante é força radial excêntrica, que teoricamente seria de suma importância quando se abordam lesões muito calcificadas com consistência mais rígida. Em geral, a liga de Nitinol tem maior força radial que a liga de CoCr e stents de célula fechada têm mais força radial que os de células abertas (35, 36).

### 1.3.2 Características das ligas metálicas: biofuncionalidade e biocompatibilidade

As ligas metálicas estão entre os materiais mais antigos usados em procedimentos cirúrgicos (41-44). Os registros mais antigos datam do século 16; porém, até o fim do século 19, as tentativas de utilização de peças metálicas no corpo humano eram geralmente mal sucedidas (41, 42). A principal causa dessas

falhas era decorrente aos processos infecciosos, em virtude da falta de técnicas assépticas (42, 45). Após a introdução das técnicas cirúrgicas antissépticas por Lister, nos anos de 1880, a incidência de infecções nos procedimentos cirúrgicos caíram drasticamente e foi possível começar a identificar as reais reações adversas aos implantes (42).

Assim, foi possível definir as duas principais propriedades dos implantes metálicos com relação à sua utilização no corpo humano: a biofuncionalidade, que é a capacidade do implante exercer corretamente a função para qual foi designado; e a biocompatibilidade, que representa o quão estranho ao organismo o implante é (41-45).

Com relação aos stents carotídeos, a biofuncionalidade diz respeito basicamente às características mecânicas, como força radial, ductilidade, fadigabilidade e durabilidade, além das suas repercussões hemodinâmicas (43, 44, 45). O stent ideal precisa ser auto-ancorável, de fácil implantação e manter um fluxo mínimo pelo seu lúmen. Para tanto, o material precisa ter alta resiliência, ou seja, ser capaz de voltar à sua conformação original após ser deformado (43, 44, 46). As características que levam à alta resiliência são a alta resistência de deformação e baixo módulo de elasticidade (módulo de Young). Nesses quesitos, tanto as ligas de cobalto-cromo como a de NiTi se destacam (tabela 2) (44).

Tabela 2 – Comparação dos dados do módulo de Young e força tênsil das várias ligas metálicas (44)

Liga metálica	Densidade (g/cm <sup>3</sup> )	Módulo de Young E(GPa)	Tensão de estiramento $\sigma_{TE}$ (Mpa)	Resistência à tração $\sigma_{RT}$ (Mpa)
Aço inoxidável 316L				
Recozido	-	-	170	480
30% laminado a frio	7,9	200	840	910
80% laminado a frio			1100	1.350
Liga Co-Cr-Mo	8,3 - 9,2	210 - 240	300 - 1.500	800 - 1.800
Titânio CP	4,5	110	280	345
Ti-6Al-4V	4,5	110	900 - 1.000	1.050 - 1.100
Ti-6Al-7Nb	4,7	100	900	1.050
Ti-5Al-4.5Fe	4,5	110	780	860
Ti-13Nb-13Zr	5,6	80	900	1.030
55 Nitinol	6,45	70	103 138	860
60 Nitinol	6,71	113	900 - 1.000	945 - 1.060
Fio de Nitinol	-	33	Próximo a $\sigma_{RT}$	1585 - 1.725

Existem hoje inúmeras ligas metálicas (quadro 1) que apresentam excelentes características mecânicas; porém, o número de ligas com possibilidade de uso cirúrgico é limitado, em virtude da sua biocompatibilidade (42, 44, 45).

Quadro 1 – Principais próteses utilizadas hoje em dia na prática médica e suas principais ligas metálicas constituintes (44)

Divisão	Exemplos de implantes	Tipo de metal
Cardiovascular	Stent	316L SS; CoCrMo; Ti
	Válvula artificial	Ti6Al4V
Ortopedia	Fixação óssea (placa, parafuso, pinos)	316L SS; Ti; Ti6Al4V
	Articulações artificiais	CoCrMo; Ti6Al4V; Ti6Al7Nb
Odontologia	Aparelho ortodôntico	316L SS; CoCrMo; NiTi; TiMo
	Enchimento	AgSn(Cu) amálgama, Au
Craniofacial	Placa e parafuso	316L SS; CoCrMo; Ti; Ti6Al4V
Otorrinologia	Tímpano artificial	316L SS

A biocompatibilidade é definida por William como:

*“A capacidade de um biomaterial de desempenhar a sua função desejada no que diz respeito a uma terapia médica, sem induzir quaisquer efeitos locais ou sistêmicos indesejáveis na estrutura orgânica ou no beneficiário da terapia, mas gerando a resposta celular ou tecidual mais benéfica nessa situação específica e otimizando o desempenho clínico relevante da terapia” (44).*

Podemos também considerar a biocompatibilidade como o resultado da interação do material com o meio biológico, que, ao mesmo tempo, é hostil e sensível às alterações causadas pela liga metálica (LM) (42, 44, 45). A implicação dessa interação é a degradação do material ou corrosão da liga (42, 44, 45). A corrosividade decorre basicamente da interação da liga metálica com os íons de cloro e com as proteínas plasmáticas (42, 44, 45). Atualmente, acredita-se que o fator mais importante para definir a biocompatibilidade da LM é o grau de resistência à corrosão (42, 44, 45).

A busca do material menos corrosivo em meio orgânico levou basicamente à utilização de três ligas diferentes: liga de ferro-cromo-níquel (conhecido como aço inoxidável), ligas baseadas em cobalto-cromo e ligas baseadas em titânio (42, 44, 45). A primeira liga a ser utilizada foram as ligas de aço inoxidável, na década de

1920 (42, 44, 45). Nessas ligas, o principal componente para garantir a adequada resistência à corrosão é o cromo, sendo necessário pelo menos 12% desse elemento para que haja a formação da camada de óxido de cromo ( $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ) ao redor do implante (42, 44, 45). São as camadas de óxidos ao redor do implante que isolam os componentes metálicos dos íons cloretos e das proteínas plasmáticas (42, 44, 45). Atualmente, a liga de aço inoxidável utilizada em implantes médicos possui 18% de cromo, 8% de níquel, quantidades variáveis de molibdênio e 0,003% de carbono, liga essa conhecida como aço inoxidável 316L (42, 44, 45).

Já as ligas de titânio são caracterizadas por sua baixa densidade ( $4,5\text{gr}/\text{cm}^3$ , contra  $7,9\text{gr}/\text{cm}^3$  para aço inoxidável 316L e  $8,3\text{gr}/\text{cm}^3$  para ligas de cobalto-cromo) e, quando associadas ao níquel, formam a liga conhecida como Nitinol, que apresentam importante memória espacial e flexibilidade (42, 44, 45). A resistência à corrosão das ligas de titânio é decorrente da formação da camada de óxido de titânio ( $\text{TiO}_2$ ) em sua superfície (figura 7) (45).

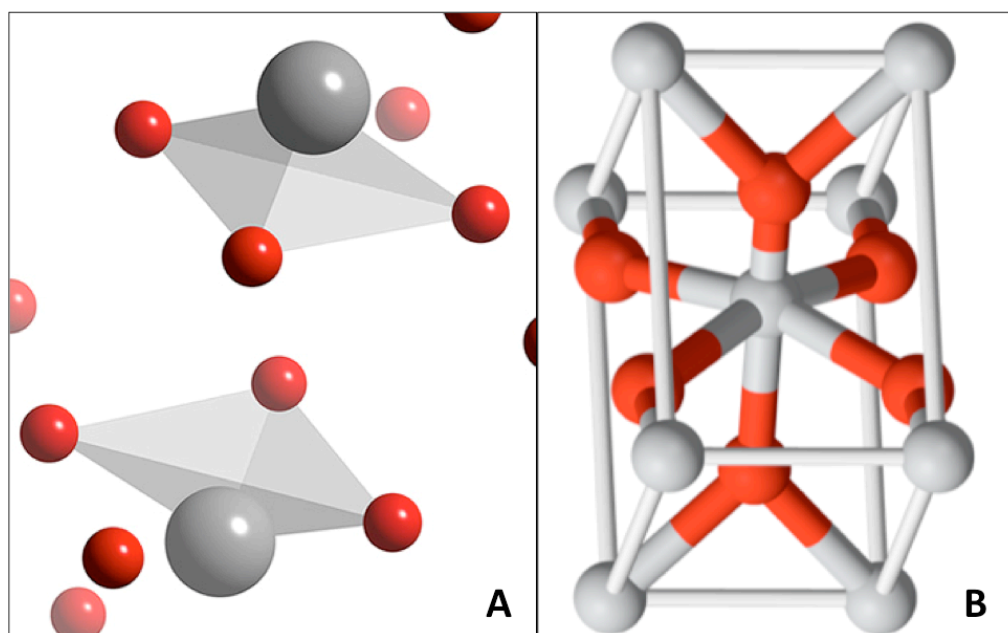


Figura 7. Desenho esquemático da molécula de  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  (A) e  $\text{TiO}_2$  (B) (modificado e autorizada a utilização por <http://rruff.geo.arizona.edu/AMS/result.php>)

As ligas de cobalto-cromo apresentam excelente resistência à corrosão, em decorrência da camada de  $\text{Cr}_2\text{O}_3$ , assim como a liga de aço inoxidável. Porém, nas

ligas CoCr essa camada tende a se apresentar mais estável, em virtude do alto teor de cromo (cerca de 30%) nessas ligas (42, 44, 45).

De uma forma geral, todas as ligas metálicas utilizadas nos stents Carotídeos são classificadas como metais biocompatíveis ou passivos, ou seja, apresentam uma camada de óxido estável em sua superfície (41, 42, 44, 45).

Em simulações laboratoriais com soluções semelhantes à fisiológica (soluções tampão), foi possível identificar o potencial elétrico de repouso (PR), entre a superfície metálica e a solução. Nesse potencial a camada de óxido permanece estável, não havendo risco de corrosão. Entretanto, em virtude da liberação lenta de íons metálicos no meio, o PR decai progressivamente até chegar ao potencial elétrico de quebra (PQ), quando a camada de óxido começa a se desfazer, iniciando o processo de corrosão (42, 44). Assim, foi possível identificar 3 tipos de comportamentos das diversas LM existentes:

1. Potencial de repouso decai rapidamente, acarretando rápida destruição do material.
2. Potencial de repouso permanece por longa data em nível alto, indicando material biocompatível.
3. Queda leve do potencial, que indica que algumas áreas sofreram corrosão (42, 44).

Os metais protéticos em geral apresentam o comportamento do segundo tipo (42, 44). Assim, quanto maior é a distância do PR para o PQ, mais estável é a superfície de óxido e mais “inerte” seria o material (42, 44). No caso das ligas de aço inoxidável, os dois potenciais são próximos; logo, essas ligas são pouco resistentes aos insultos do corpo (42, 44). Nas ligas de cobalto-cromo, o PR se situa a razoável distância do PQ (PR de 0,5V e PQ de 0,85V), de tal forma que, salvo situações adversas, é pouco provável que haja destruição da camada (42, 44). Já para as ligas de titânio, a diferença é tanta (PR de 0,23 e PQ de 24V) que a quebra é quase impossível em condições fisiológicas (tabela 3) (42, 44).

Tabela 3 – Potencial de repouso e potencial de quebra da camada de óxido das diversas ligas metálicas dos biomateriais (44)

Material	Potencial de repouso (V) após 480 h em solução de 0,17 M de NaCl	Potencial de ruptura (V) em 0,17 M em solução de NaCl
Aço inoxidável 304	0,20	0,20
Aço inoxidável 316	0,30-0,50	0,4-0,48
Molde liga CoCr	0,50	0,87
Titânio	0,37	9,00
Liga Ti típica	0,23	25
Tântalo	0,36	24

Os principais mecanismos de corrosão são: corrosão intergranular, corrosão *crevice*, *pitting*, corrosão *fretting* e corrosão galvânica (41, 42, 45). Como a corrosão das próteses vasculares ocorrem em meio líquido, ela apresenta o comportamento do tipo galvânica (Figura 8), com a formação de cátodo pelas proteínas plasmáticas e do ânodo pela liga metálica (41, 42, 45)

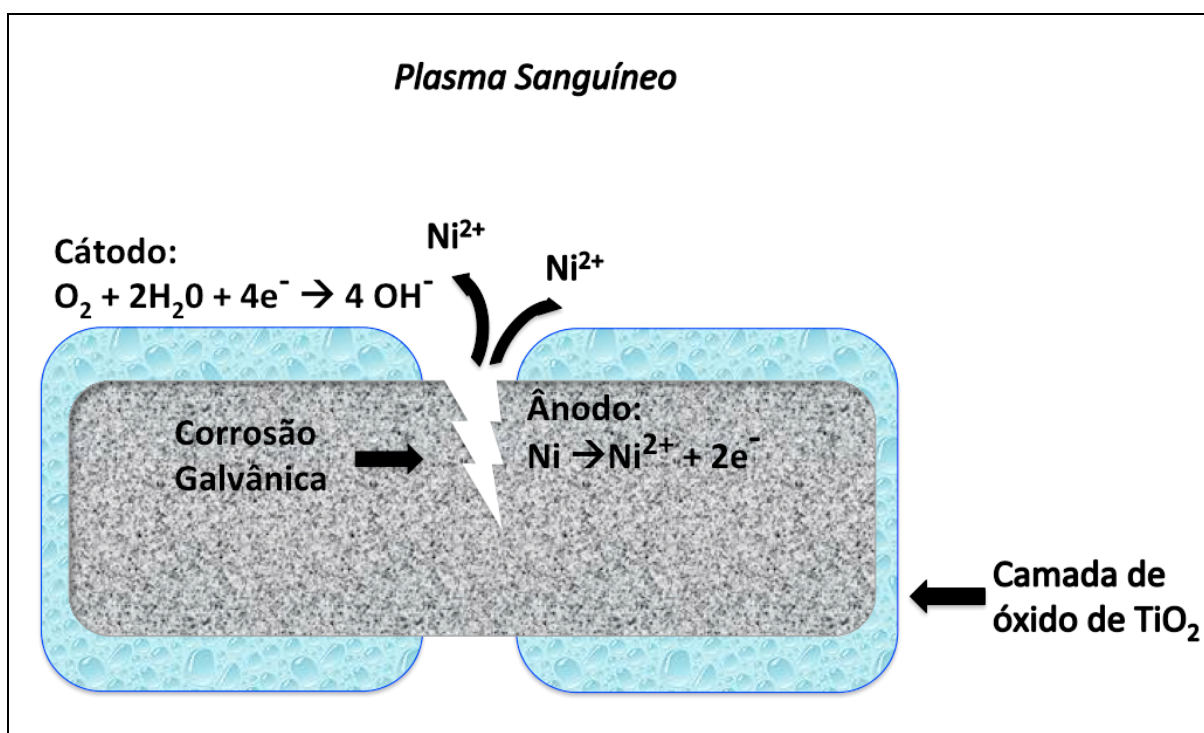


Figura 8. Desenho esquemático da corrosão galvânica e prótese de Nitinol, com a liberação de níquel iônico no plasma (44)

Com a quebra da superfície de óxido e exposição dos íons metálicos, as proteínas plasmáticas aderem à superfície da LM, iniciando os dois principais eventos deletérios dos implantes vasculares: a ativação da cascata de coagulação

com a formação de trombos e início do processo inflamatório tipo corpo estranho (41, 42, 44, 45).

Entretanto, dois fatos observados nas últimas décadas vieram questionar esse modelo unifatorial da corrosão metálica versus biocompatibilidade: a presença de resposta inflamatória organizada tipo corpo estranho em próteses sem sinais microscópicos de corrosão e a detecção de íons metálicos na corrente sanguínea, urina e em tecidos distantes (41, 42, 44, 45). Há relatos de detecção à distância de íons metálicos após implante de próteses à base de cobalto-cromo e titânio, mesmo sem que se verifique virtualmente nenhum sinal de corrosão (42, 44, 47). Cerca de 2mm de tecido fibrótico e outras reações inflamatórias são geralmente observadas ao redor dos implantes no primeiro mês após o implante, período no qual não se espera corrosão significativa (41, 42, 43, 44, 45, 48). Outros produtos liberados ao meio circunjacente, como nanofragmentos da LM, também parecem influenciar na rejeição do hospedeiro ao implante (44, 45, 48).

Os reais efeitos deletérios que a liberação desse subprodutos possa causar, apesar de já bem documentada, ainda são pouco esclarecidos. O mesmo pode ser dito com relação à participação da liberação desses produtos na Biocompatibilidade final do implante, quando comparada à resistência à corrosão (41-45, 48). Entretanto, podemos afirmar que a resposta tecidual ao implante é diretamente relacionada ao grau da corrosão e à quantidade de produtos tóxicos liberados pela liga metálica (41-45, 47).

Em suma, as ligas metálicas devem ser as mais biocompatíveis possíveis. Tal característica é adquirida essencialmente pela maior resistência à corrosão quando expostas ao plasma, e pela menor liberação de íons metálicos e outras partículas (41-49). Contudo, diferentes graus de ativação inflamatório tipo corpo estranho já foram reportados após a implantação de stents ditos inertes (41-49). Essa resposta inflamatória se inicia com a ligação das proteínas plasmáticas, principalmente as proteínas do complemento, à superfície do SC, seguido da ativação das células inflamatórias, em especial e inicialmente, dos neutrófilos (41-49).

### **1.3.3 Re-estenose neo-intimal**



A re-estenoses e/ou formação de trombo intra-Stent são complicações ainda frequentes após a AS (16, 30, 31-34, 48). A re-estenose pode ocorrer precoce ou tardiamente, ou seja, antes ou após 6 meses do procedimento (16, 30, 31, 48). A forma precoce decorre basicamente da formação de trombos plaquetários na parede da malha metálica do stent, com ativação da cascata de coagulação e re-obliteração da luz (16, 30, 31). A re-estenose precoce é basicamente dependente da trombogenicidade da liga metálica (16, 30, 31). O uso de anti-agregantes plaquetários e anticoagulação após a implantação do SC objetiva minimizar esses eventos (16, 30, 31).

A re-estenose tardia apresenta incidência média de 4,8% em dois anos e é decorrente, sobretudo, da proliferação neo-intimal peri-Stent (16, 30, 31). Evidências crescentes têm relacionado a proliferação neo-intimal à resposta inflamatória desencadeada imediatamente após a implantação do stent (16, 30, 31, 48). Aumento dos marcadores de resposta inflamatória, como proteína C reativa e interleucina 6 (IL-6) nas primeiras 72 horas após a implantação de stents Carotídeos pode dobrar a incidência de re-estenose intra-luminal (50-53, 55).

Durante a implantação do stent Carotídeo ocorrem lesões mecânicas teciduais na parede endotelial do vaso e da placa ateromatosa, iniciando-se a cascata de formação de prostaglandinas e ácido araquidônico (48-56). Essa reação é tanto maior quanto maior for a lesão tecidual direta e quanto maior for a lesão da camada elástica dos vasos (48-56). No endotélio adjacente, as substâncias inflamatórias do ciclo araquidônico estimulam a expressão de proteínas de adesão leucocitária e a produção de mais citocinas inflamatórias e quimiotaxinas (48-57). Essa mudança no ambiente bioquímico ao redor do stent acarreta, inicialmente, agregação de plaquetas, com liberação de mais citocinas e quimiotaxinas, seguido da atração de células inflamatórias e migração das mesmas para a camada muscular dos vasos (56-58). Inicia-se uma cascata de liberação e auto-estimulação de substâncias inflamatórias e fatores de crescimento (como o fator de crescimento plaquetário e endotelial), caracterizando quadro inflamatório agudo, o que estimula a proliferação do endotélio sadio adjacente para recobrir a área lesada (56-58). Em situações cotidianas, essa resposta é autolimitada e perdura apenas até a neo-endotelização da área lesionada (cerca de uma semana) (57,58).

Entretanto, o corpo estranho atua como perpetuador da resposta inflamatória aguda e indutor da resposta inflamatória crônica, quadro conhecido como resposta inflamatória tipo corpo estranho (57, 58). Com a persistência do quadro inflamatório, o crescimento endotelial continua sendo estimulado ao ponto de novamente reduzir a luz arterial (50-55).

Dessa forma, a re-estenose tardia é primordialmente dependente da biocompatibilidade da LM utilizada, ou seja, da propriedade de gerar a menor resposta inflamatória do tipo corpo estranho possível (42, 44, 50-55).

#### 1.4 REAÇÃO TIPO CORPO ESTRANHO DOS STENTS CAROTÍDEOS

A reação tipo corpo estranho é o resultado final das respostas inflamatórias e de reparação após a agressão desencadeada pelo implante de um dispositivo médico, próteses ou biomateriais (58, 59). Praticamente todos os tipos de células inflamatórias estão presentes em alguma fase da reação ao corpo estranho (58, 60). Pode-se ressaltar como principal mediador e efetador inflamatório da fase aguda (1ª a 3ª semanas) os neutrófilos, e como principal mediador e efetador da fase crônica (da 2ª semana até toda a vida útil do material) os linfócitos e os macrófagos, respectivamente (57, 58, 60). A reação de corpo estranho pode afetar a biofuncionalidade do dispositivo médico implantado, com impacto significativo em curto e longo prazo nos resultados terapêuticos (58, 59).

Precocemente, com a lesão do tecido conectivo vascularizado na implantação do biomaterial, ocorrem interações com a adesão entre as proteínas plasmáticas e a superfície do material estranho, seguida da organização em uma matriz provisória (58-63). Essa matriz provisória é basicamente formada por trombo e pelas proteínas dos sistemas de coagulação intrínseco e extrínseco, do sistema complemento e do sistema fibrinolítico na interface do tecido com o material (58-63). Essa cascata de proteínas interage de forma dinâmica, com adesões e separações, num fenômeno conhecido como o efeito Vroman (58). Associado à formação da matriz provisória, inicia-se a cascata inflamatória do ácido araquidônico, com geração de cinina, quimiotaxinas, prostaglandinas, mitogênicos, citocinas, fatores de crescimento e outros agentes bioativos que modulam a ativação das células inflamatórias e das

plaquetária (57-63). Assim, a matriz provisória fornece componentes estruturais, bioquímicos e celulares para os processos de cicatrização de feridas (57-63).

Em conjunto com a formação de matriz provisória, inicia a fase de inflamação aguda, sendo diretamente dependente da biocompatibilidade do biomaterial, da extensão da lesão no momento do implante, do tipo de tecido ou do órgão no qual o dispositivo é implantado e da extensão da formação da matriz provisória (58, 59). A atividade dos leucócitos polimorfonucleares, em especial os neutrófilos e mastócitos, caracteriza a resposta inflamatória aguda (58-61).

A interação entre as proteínas plasmáticas aderidas ao implante com os receptores de adesão presentes nas células inflamatórias constitui o principal sistema de reconhecimento celular para os materiais sintéticos (57-60). As proteínas plasmáticas aderidas, tais como albumina, fibrinogênio, fibronectina, vitronectina,  $\gamma$ -globulina, do complemento e outras modulam a migração e ativação das células inflamatórias (57-61). Nesse momento, as características do biomaterial são de primordial importância, já que quanto menor for a biocompatibilidade do material utilizado, maior será a agregação de proteínas plasmáticas (58, 59).

As proteínas de membrana celular que interagem com as proteínas plasmáticas são chamadas integrinas (58, 59, 64). As integrinas são uma grande família de receptores de superfície celular que medeiam a interação entre a célula e a matriz extracelular, bem como as interações intercelulares (64). Essas moléculas de adesão permitem que as células migrem através da matriz extracelular e medeiam a transdução de sinal entre a célula e o ambiente (64). São heterodímeros constituídos por subunidades diferentes  $\alpha$  e  $\beta$ . A composição de diferentes cadeias de subunidade confere variabilidade e especificidade da integrina, ou seja, há um tipo de integrina para cada tipo de célula inflamatória. Sua expressão sequencial é um dos responsáveis pelas fases sequenciais da reação de corpo estranho (64).

Após a inflamação aguda, inicia-se a fase de inflamação crônica, com a presença de células mononucleares (monócitos/macrófagos e linfócitos) no local do implante e com formação do tecido de granulação, caracterizado pela presença de fibroblastos e neovascularização no tecido de cicatrização (58-63). A chegada e a ativação dos macrófagos no local do implante conduzem a uma maior propagação de sinais quimioatrativos. A produção pelos macrófagos de PDGF, fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina 6 (IL-6), fator de estimulação de colônias de

granulócitos (G-CSF) e fator de estimulação de colônias de granulócitos macrófagos (GM-CSF) chama mais macrófagos ao local da ferida (58-63).

A inflamação crônica é menos uniforme histologicamente do que inflamação aguda que é normalmente de curta duração e está confinada no local do implante (58, 59).

A interação e a modulação da atividade dos macrófagos com matriz inflamatória na fase crônica se fazem basicamente por sua integrina específica (58-59, 64). As integrinas são também responsáveis pelo controle do ciclo celular (58, 59, 64). Após o desprendimento da integrina, nos macrófagos inicia-se o processo de apoptose celular, mediado pela via FAK. A separação entre a integrina do macrófago com as proteínas plasmáticas ou da matriz pode ainda ser modulada pela via da caspase-3, uma proteína basicamente produzida pelos neutrófilos. Assim, apesar das células predominantes na fase crônica serem os macrófagos e as células gigantes, os neutrófilos mantêm uma importante atividade moduladora, sendo possivelmente um dos maiores responsáveis pela perpetuação do processo inflamatório agudo e crônico (58, 59, 64).

Outro ponto importante na fase crônica da resposta de corpo estranho é a formação de células gigantes por meio da fusão célula-célula de macrófagos (58, 59, 61, 63). As IL-4 e IL-13, produzidas e liberadas pelos linfócitos, aparentam ser os principais indutores da fusão celular (figura 9) (58, 59, 63). Os mecanismos moleculares exatos que levam à fusão de macrófago não foram completamente elucidados. Contudo, acredita-se que a IL-4 induza a fusão por meio dos receptores  $\beta 1$  de integrina (58).

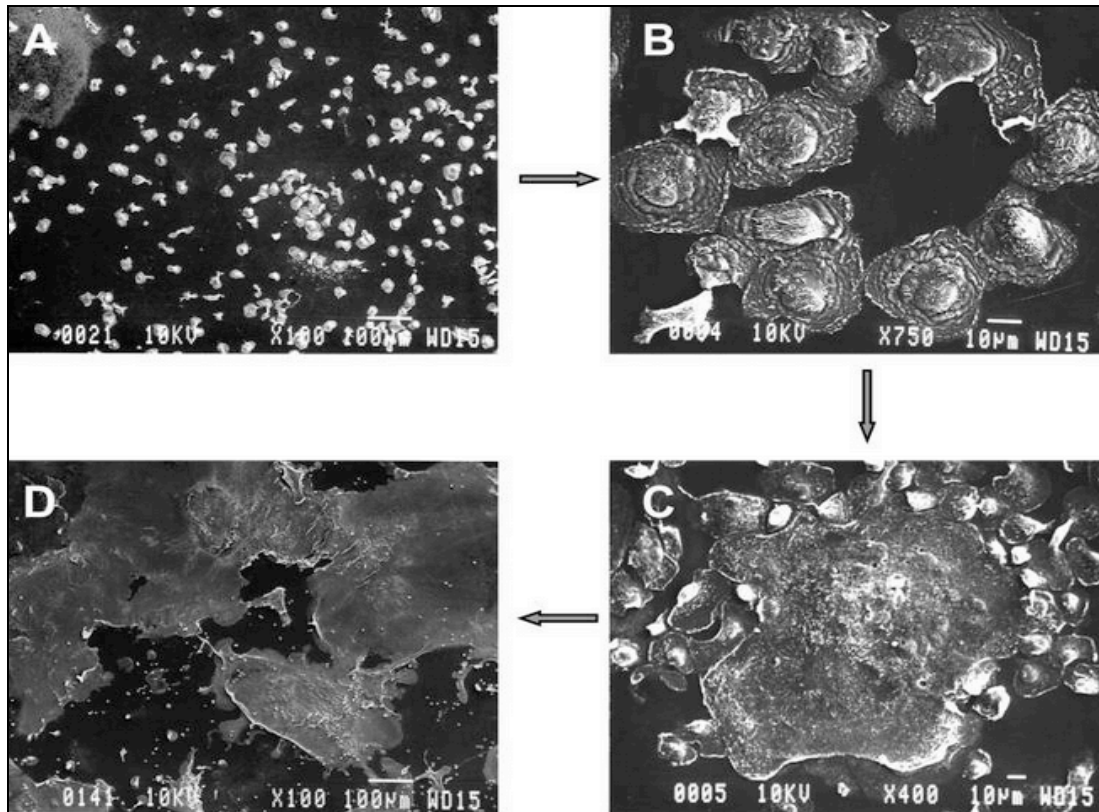


Figura 9. Imagens seriadas em microscopia eletrônica de varredura da transição de monócitos (A) para macrófagos (B) seguida pelo processo de fusão (C) para células gigantes (D) (Autorizado utilização por 57)

Os macrófagos ativados secretam fatores de crescimento e fatores angiogênicos, metaloproteinases de matriz e os fatores pró-fibrogênicos, que aumentam a atividade de fibroblastos (58, 59, 62, 63). Assim, macrófagos estimulados por biomateriais podem secretar proteínas que modulam a fibrose e, por sua vez, estimulam a formação da cápsula fibrosa que se desenvolve em torno do material (58, 59, 62, 63). Essa cápsula fibrótica é processo final da reação tipo corpo estranho (58, 59, 62, 63).

### 1.5 NEUTRÓFILOS E REAÇÃO TIPO CORPO ESTRANHO

Os neutrófilos são os granulócitos mais abundantes na circulação, e possuem um papel primordial na defesa do organismo. Representam cerca de 70% das células leucocitárias e são as primeiras células inflamatórias a migrar através do

endotélio adjacente ao local de inflamação, atuando como a primeira barreira imunológica no sítio inflamado ou infectado (65). Entretanto, também estão envolvidos na patogênese de diversas condições, como aterosclerose, lesão pós-reperfusão isquêmica e, mais recentemente, na rejeição de enxertos e implantes endovasculares (65-67).

Estudos têm evidenciado presença de neutrófilos no miocárdio de murinos dentro da primeira hora pós-transplante cardíaco e após o implante de stents Coronarianos (68,69). Os mesmos estudos também evidenciaram que a inibição da migração de neutrófilos se mostrou favorável para aumentar a viabilidade de enxertos (reduzir sua rejeição) e para diminuir a re-estenose (68, 69).

### 1.5.1 Função executora

A noção de que a inflamação é a resultante do desequilíbrio pró e contra vias inflamatórias é bem ilustrada pela dupla função dos neutrófilos, que combinam um papel anti-infeccioso e pro-inflamatório (65, 66).

Os neutrófilos estão divididos no sangue entre um *pool* circulante, presente no fluxo axial de pequenos vasos e um *pool* marginal, localizado nas margens dos grandes vasos sanguíneos. Na ausência de inflamação, o *pool* marginal compreende os granulócitos transicionais presos em capilares estreitos, principalmente no pulmão e no fígado (65, 66).

No processo inflamatório, ocorre rápido remanejamento dos neutrófilos marginais para corrente sanguínea, induzido pela interação entre CD11b/CD18 integrinas e L-selectina (70-72).

Após chegar ao sítio inflamatório, inicia-se o processo de migração transepitelial de neutrófilos mediado pelas L, E e P-selectinas expressas pelas células endoteliais próximas ao sítio inflamado. A P-selectina é rapidamente (minutos após a injúria) mobilizada para a superfície das células endoteliais após a estimulação por trombina, histamina ou espécies reativas de oxigênio. Ela interage principalmente com um receptor semelhante à mucina PSGL-1 (P-selectina glycoprotein ligand-1), localizado na extremidade das microvilosidades dos leucócitos (65, 69-72). Posteriormente, a E-selectina são expressas nas células

endoteliais 1 a 2 horas após a estimulação endotelial por IL-1, TNF $\alpha$  ou produtos da parede bacteriana (LPS) (65, 70, 71). Os receptores da E-selectina incluem PSGL-1 e ESL-1 (E-selectin-ligand 1) (65, 70, 71). Ao contrário de P e E-selectinas, a L-selectina está presente constitutivamente. Sua capacidade de ligação é, contudo, de forma rápida e transitória, sendo mais duradoura no endotélio inflamado (65, 70, 71).

O endotélio inflamado produz quimiotaxinas, tais como o fator ativador de plaquetas (PAF), leucotrieno B<sub>4</sub>, além de várias outras quimiocinas, apresentadas na superfície endotelial, como a interleucina 8 (IL-8), que exerce papel quimiotático especificamente sobre os neutrófilos, não tendo efeito sobre os outros leucócitos (65, 70-72). As células endoteliais não só sintetizam a IL-8 em resposta à IL-1 ou LPS, mas também armazenam IL-8 em corpos de Weibel-Palade, liberando-os após estimulação pela histamina ou trombina (65, 70-72).

Por sua vez, os neutrófilos apresentam vários receptores para quimiotaxinas e citocinas, que pertencem à superfamília de receptores de heteroproteínas serpinginosas transmembrânicas ligadas à GTP intracelular (65, 70-73). O envolvimento desses receptores acoplados à proteína G desencadeia uma variedade de cascatas de transdução de sinal que levam à firme adesão de leucócitos e ativação de movimento específico em direção à maior concentração de citocinas, além de uma vasta variedade de funções, tais como desgranulação e formação de espécies reativas de oxigênio (65, 70-73). A desgranulação e formação de EROs não ocorrem normalmente durante a adesão inicial às células endoteliais, mas são postergadas até os leucócitos atingirem o foco inflamatório. Ceramida e esfingomielinase, resultantes da atividade do TNF $\alpha$ , têm sido propostos como responsáveis por esse atraso (65, 70-73).

Firme adesão de neutrófilos às células endoteliais parece envolver exclusivamente a interação das integrinas de leucócitos da subfamília  $\beta$ 2 (CD11a, CD11b, CD11c/CD18) com ICAM-1. Isso difere da interação de monócitos e linfócitos, que reagem por meio de integrina da subfamília  $\beta$ 1 com VCAM-1 endotelial (65, 70-73). As  $\beta$ 2 integrinas são incapazes de interagir com seus receptores específicos nos neutrófilos não estimulados, tornando-se um mecanismo de segurança que controla as respostas inflamatórias agudas e crônicas (65, 70-73). Vários agonistas CD11b/CD18 desencadeiam a ativação de neutrófilos, incluindo quimiotaxinas (PAF, IL8, fMLP, C5a), citocinas e fatores de crescimento (TNF $\alpha$  ou GM-CSF), além de produtos bacterianos (peptídeos formilados e LPS) (65, 70-73).

A migração transepitelial dos neutrófilos ocorre predominantemente nas bordas das células endoteliais, após ocorrer a descontinuidades de junções intercelulares (65, 70-73). Duas moléculas da família das CAMs têm mostrado grande importância nesse processo: a molécula endotelial de adesão plaquetária 1 (PECAM-1 ou CD31) e, mais recentemente, a molécula de adesão juncional (JAM) (65, 70-73). A PECAM-1 é expressa tanto na superfície dos neutrófilos quanto na junção da célula endotelial. A JAM é seletivamente concentrada nas junções estreitas inter-endoteliais, mas não estão presentes em neutrófilos (65, 70-73).

Neutrófilos migram nos tecidos seguindo gradiente de quimiotaxinas (65, 70-73). Essas quimiotaxinas, produzidas por bactérias, por células ao morrer ou por várias células estromais e epiteliais nos tecidos inflamados, estão ligadas a componentes da matriz extracelular (65, 70-73). As vias de sinalização cruzadas entre os receptores das quimiotaxinas podem resultar em dessensibilização para uma ou outra quimiotaxina, direcionando o neutrófilo para área de maior interesse (65, 70-73).

A migração de neutrófilos através da matriz extracelular é mediada por suas integrinas  $\beta$ 1, 2 e 3. Essas proteínas permanecem armazenadas nos grânulos dos neutrófilos e são rapidamente expressas após o processo de ativação durante a transmigração endotelial (figura 10) (64, 65, 70-73). A locomoção decorre de um processo sequencial de aumento e diminuição da afinidade das integrinas em direção ao alvo inflamado (64, 65, 73).

Os neutrófilos integram os sinais de acoplamento das integrinas com os sinais simultâneos das citocinas inflamatórias e das quimiotaxinas para ativar uma cascata de eventos intracelulares (por meio de ativação de várias tirosinas-quinases), que resultam na difusão, locomoção, desgranulação e produção de EROs (65, 70-73).



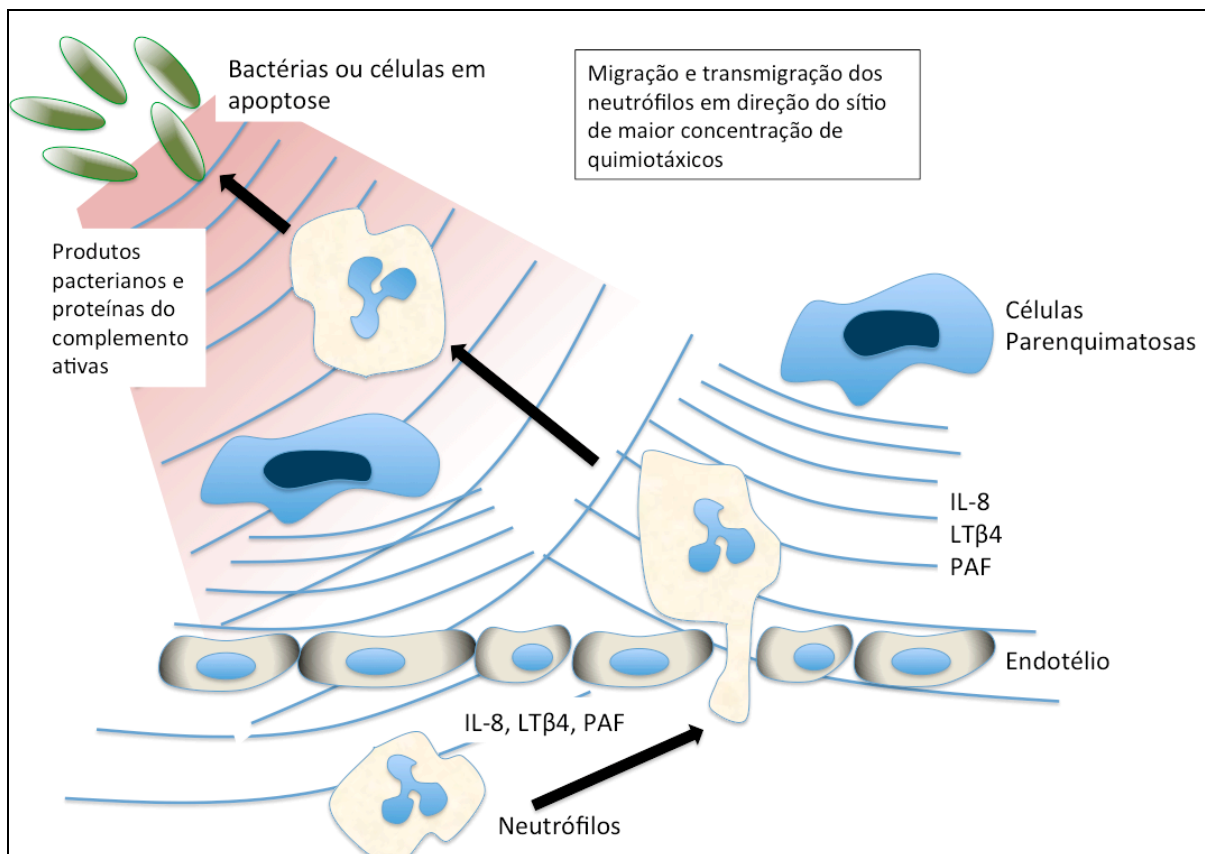


Figura 10. Desenho esquemático da transmigração e migração dos neutrófilos durante o processo, em decorrência da estimulação pelos produtos inflamatórios (Adaptado de 65)

A fagocitose dos neutrófilos envolve duas classes diferentes: receptores Fcγreceptores (FcγRIIA ou CD32 e FcγRIIIB ou CD16) e receptores de complemento (CR1 ou CD35 e CR3 ou CD11b/CD18 integrina). As vias de sinalização desencadeada por essas duas classes de receptores são diferentes no processo fagocítico (64, 65, 70-73).

O papel exato dos Fcγreceptores ainda não está claro, mas sabe-se que estão associados à produção de espécies reativas de oxigênio e citocinas. Já os receptores de complemento atuam como moderadores positivos dos mecanismos iniciados pelos Fcγreceptores. A adesão aos receptores CR1 e CR3 não é suficiente para promover a fagocitose, a menos que os neutrófilos já estejam ativados (64, 65, 70-73).

Vias de sinalização complexas promovidas pelo englobamento dos alvos opsonizados conduzem à fusão de grânulos ricos em protease, como os fagossomos, e desencadeiam a atividade oxidativa (64, 65, 70-73).

Além da fagocitose, a ativação neutrofílica leva à produção e liberação de seus grânulos (figura 11). As moléculas microbicidas derivadas de neutrófilos são embaladas em grânulos, que são liberados com a ativação da célula (64, 65, 70-73). Existem praticamente quatro grupos de grânulos: os azurófilos, os ricos em lactoferrina e colagenase, os ricos em gelatinase e as vesículas secretoras (64, 65, 70-73). Os grânulos são considerados os verdadeiros compartimentos microbicidas, capazes de serem mobilizados durante a fagocitose (64, 65, 70-73).

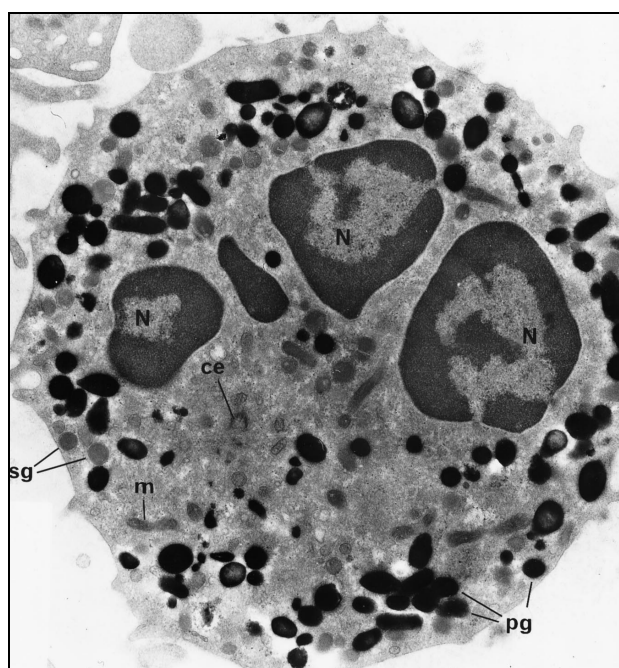


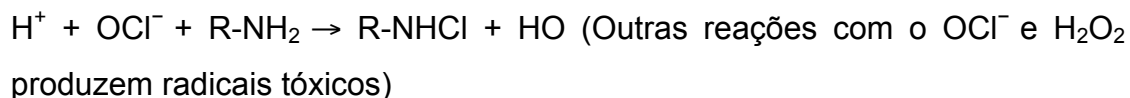
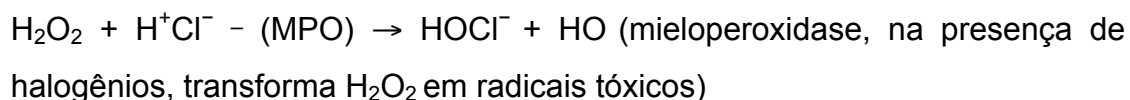
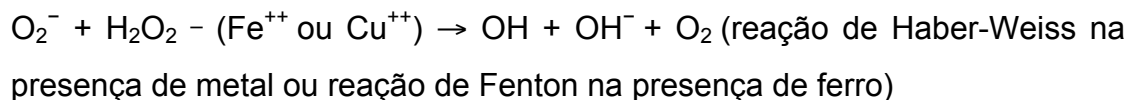
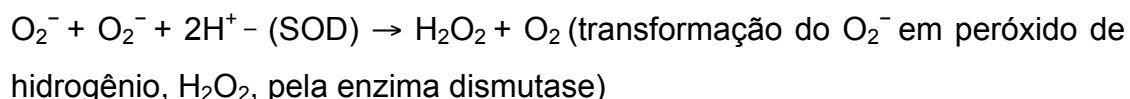
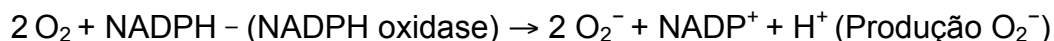
Figura 11. Microscopia eletrônica de transmissão de um neutrófilo ativado evidenciando seu núcleo multilobulado (N), a grande quantidade de mitocôndrias (m) e citoesqueleto (e), além de seus inúmeros grânulos (sg e pg) (publicação autorizada por 65)

A eficiência antimicrobiana dos neutrófilos humanos depende de dois eventos simultâneos que ocorrem no fagolisossomo: a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e a liberação do conteúdo de proteínas enzimáticas (64, 65, 70-73). As integrinas CD11b/CD18 também desempenham um papel importante nessa fase. Elas interagem com proteínas de membrana GPI, como a Fc $\gamma$ RIIIb (CD16b) e o receptor de LPS CD14. Fc $\gamma$ RIIIb interage com CD11b/CD18, promovendo a fagocitose dependente de anticorpo, enquanto que a interação CD14 com

CD11b/CD18 pode desempenhar um papel na geração de mediadores pró-inflamatórios (65, 70-73).

A ativação do metabolismo oxidativo, conhecido como explosão respiratória, inicia-se com a atividade da nicotinamida adenina dinucleotídeo fostato oxidase (NADPH-oxidase) (64, 65, 70-73). Gera-se daí uma grande variedade de reagentes oxidantes, incluindo derivados halogenados oxidantes, que geram a mieloperoxidase (MPO). A MPO amplifica o potencial tóxico de  $H_2O_2$  pela produção de intermediários reativos (64, 65, 70-73).

De forma sintética, podem-se relatar abaixo as reações para formação dos EROs na explosão respiratória (65, 72, 73):



As espécies reativas de oxigênio reagem rapidamente e de forma não específica com biomoléculas, como DNA, proteínas, lipídios e carboidratos, causando danos no DNA, peroxidação lipídica e oxidação de proteínas (65, 72, 73). Outra consequência da produção de espécies reativas de oxigênio é a discreta acidificação ou neutralização do lúmen do fagossomo para que as proteases

liberadas pelos grânulos tenham ambiente com pH ótimo para sua ativação (65, 72, 73).

Como já dito, além das espécies reativas de oxigênio, os neutrófilos também liberam proteínas enzimáticas antimicrobianas. Os grânulos azurófilos contêm a maior parte das proteínas antimicrobianas, que são liberadas nos fagolisossomos (65, 72, 73). Um dos participantes mais ativos na defesa do hospedeiro contra as infecções bacterianas gram-negativas é a proteína bactericida de aumento da permeabilidade (65, 72, 73). Outro grupo importante de peptídeos antimicrobianos é o das beta-defensinas, que compreendem quatro membros: de HNP1 a HNP4. As defensinas são ativas contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, induzindo também o aumento de permeabilidade bacteriana (65, 72, 73).

Outra classe importante são as proteases derivadas de neutrófilos, que possuem a capacidade de degradar a maior parte dos componentes da matriz extracelular. De acordo com a bioquímica do sítio inflamado, quatro classes distintas de proteinases podem ser identificadas: serina-proteases, metaloproteinases, tiol-proteases e proteases de aspartato (65, 72, 73).

As primeiras duas desempenham papel importante na degradação de proteínas extracelulares, enquanto que as duas outras estão envolvidas na digestão da proteína intracelular (65, 72, 73). Como exemplos de serina-proteases, há a catepsina G, elastase, proteinase 3 e a azurocidina enzimaticamente inativa ou CAP-37 (65, 72, 73). Além do efeito proteolítico, as proteases podem mediar a agregação plaquetária e exercer efeitos imunomoduladores. Tanto a elastase quanto proteinase-3 são capazes de induzir a síntese de IL -8 em células endoteliais (65, 72, 73).

As metaloproteinases de matriz (MMPs) constituem uma família de enzimas intimamente relacionadas que desempenham papéis importantes numa variedade de processos fisiológicos e patológicos de degradação da matriz (65, 72, 73). São enzimas que possuem um sítio ativo dependente de zinco (por isso o nome metalo) e necessitam da ativação por meio ambiente inflamado para agirem (65, 72, 73). Os neutrófilos contêm metaloproteinases, tais como a colagenase (MMP-8) e gelatinase (MMP-9), que, além de degradarem as fibras de colágeno tipo I e V, modulam a atividade neutrofílica por meio do desprendimento dos Fcγreceptores (65, 72, 73).

### 1.5.2 Função reguladora

Além de atuar ativamente no processo final da resposta inflamatória, um número crescente de evidências mostram que os neutrófilos são, ao mesmo tempo, alvo e fonte de diversas citocinas inflamatórias, quimiotaxinas e fatores de crescimento, exercendo suas funções de forma quase autorregulatória (64, 65, 68, 70, 71, 73). Os neutrófilos são alvos de importantes citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 e TNF- $\alpha$ ; de quimiotaxinas, como IL-8; e fatores de crescimento (fator de estimulação de colônias de granulócitos/monócitos – G-CSF e GM-CSF) (64, 65, 68, 70, 71, 73). As citocinas, de forma geral, amplificam várias funções de neutrófilos, incluindo a capacidade de se aderirem às células endoteliais e de produzirem espécies reativas de oxigênio (64, 65, 68, 70, 71, 73). As quimiotaxinas atuam como atrativos potentes e favorecem sua migração para o local inflamatório (64, 65, 68, 70, 71, 73). Uma questão importante é que tanto as citocinas quanto as quimiotaxinas atuam como agentes de pré-ativação de neutrófilos (64, 65, 68, 70, 71, 73).

O conceito de que os neutrófilos são fonte de citocinas é recente (64, 65, 68, 70, 71, 73). Na realidade, os neutrófilos foram, por muito tempo, considerados como desprovidos de atividade de transcrição e incapazes de realizar, de forma substancial, sínteses de proteínas (64, 65, 68, 70, 71, 73). No entanto, evidências moleculares convincentes mostraram que os neutrófilos sintetizam e libertam de forma consistente uma vasta gama de citocinas pró-inflamatórias, anti-inflamatórias e fatores de crescimento (quadro 2) (64, 65, 68, 70, 71, 73).

Quadro 2 – Exemplos de produtos inflamatórios já identificados como produtos de neutrófilos (65)

Citocinas expressas pelos neutrófilos <i>in vitro</i>	Citocinas expressas pelos neutrófilos <i>in vitro</i>
Citocinas pró-inflamatórias	Citocinas derivadas de linfócitos T
TNF- $\alpha$	IL-10
IL-1- $\alpha$ , IL-1- $\beta$	IL-13
IL-12	
Citocinas anti-inflamatórias	
IL-1 receptor antagonico (IL-1Ra)	
Quimiocinas	Outras citocinas
IL-8	RANTES
Produto do gene relacionado ao crescimento – $\alpha$ (GRO- $\alpha$ )	MCP-2, MCP-3
Proteína 1- $\alpha$ derivada de macrófagos infiltrados (MIP-1 $\alpha$ ), MIP-1 $\beta$	
Outras citocinas e fatores de crescimento	
Interferon- $\alpha$ (IFN- $\alpha$ ), IFN- $\beta$	
...	
Fator de estimulação de colônias de granulócitos (GM-CSF)	
Fator crescimento vascular endotélio (VEGF)	
Fator crescimento hepatócitos (HGF)	
Liberação sob condições específicas	
Macrophange-CSF (M-CSF), IL-3, GRO- $\beta$	
IL-1 $\beta$ (IFN- $\gamma$ fator indução)	
TGF- $\alpha$	
Oncostatinas (OSM) e neutrofinas	
Produção ainda questionável	
IL-6, proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1), CSF de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), fator de células estaminais (SCF), e IFN- $\gamma$	

A produção de substâncias inflamatórias continua a ser inferior do que a produção pelos monócitos e linfócitos (65, 70). No entanto, quando analisamos a atividade *in vivo*, alguns pontos devem ser considerados:

- O número de neutrófilos circulantes é quase 20 vezes maior do que a de monócitos.
- No local da inflamação, os neutrófilos são as primeiras células a serem recrutadas, e predominam largamente sobre os monócitos (65, 70).

A produção de citocinas é também muito influenciada pelos agentes estimuladores; dentre eles, as citocinas e os produtos bacterianos (FLP, por exemplo) (65, 70). O padrão de citocinas produzidas por neutrófilos depende do

estímulo inicial, e sua produção é fortemente modulada por citocinas imunomoduladoras, como IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10 e IL-13 (65, 70).

Dentre os principais produtos neutrofílicos, podemos destacar TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1Ra (citocinas pró ou anti-inflamatórias) e IL-8 (quimiotaxinas) (65, 70).

Os neutrófilos ativados possuem a capacidade de expressar o TNF- $\alpha$  se estimulados por produtos bacterianos pelo próprio TNF- $\alpha$ , IL-1, GM-CSF e IL-2 (65, 70).

O TNF- $\alpha$  foi originalmente descrito como um produto de monócitos e macrófagos ativados, exibindo essencialmente atividade tumoricida. É uma citocina altamente pleotrófica pertencente à superfamília de citocinas solúveis ou ancoradas a membrana. (65, 70). Embora iniba o crescimento de células tumorais, o TNF- $\alpha$  tem efeito potencializador sobre a proliferação de determinadas células normais, como monócitos, macrófagos, linfócitos, eosinófilos e neutrófilos (65, 70). Seus efeitos pró-inflamatórios resultam principalmente no aumento da expressão de moléculas de adesão de células endoteliais e, subsequentemente, na aderência de neutrófilos ao endotélio vascular (65, 70). Finalmente, o TNF- $\alpha$  também é um agente de condicionamento para os neutrófilos, pois aumenta consideravelmente sua fagocitose, desgranulação e resposta oxidativa (65, 70).

Os neutrófilos ativados também são capazes de sintetizar RNA mensageiros de IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  e, conseqüentemente, liberam as IL-1 (65, 70). Praticamente todas as citocinas são capazes de induzir a produção de IL-1 pelos neutrófilos, mas a IL-1 $\beta$  e o TNF- $\alpha$  se destacam nessa tarefa (65, 70). A IL-1 é geralmente liberada em conjunto com o TNF- $\alpha$  e exerce efeitos semelhantes sobre neutrófilos (65, 70).

A IL-8 foi descrita pela primeira vez como uma potente quimiotaxina e ativadora de neutrófilos (65, 70). Ela é expressa em resposta a produtos bacterianos e citocinas, como TNF- $\alpha$ , e IL-1 $\beta$  e é secretada por uma variedade de células, incluindo linfócitos T, células epiteliais, ceratinócitos, fibroblastos, células endoteliais e neutrófilos (65, 70). A IL-8 é a citocina inflamatória mais abundante secretada pelos neutrófilos, sendo também o seu alvo celular principal (65, 70).

A lista de agentes capazes de desencadear a produção de IL-8 pelos neutrófilos não cessa de aumentar, e compreende todos os produtos listados no Quadro 2. Entre esses, as proteínas de complemento parecem ser o agonista mais potente da produção de IL-8 (65, 70).

### 1.5.3 Limitação da resposta inflamatória

A resposta inflamatória aguda se resolve espontaneamente graças a programas endógenos de "stop", que desligam a inflamação e limita a destruição dos tecidos do hospedeiro. (57, 65, 70-72) Nesse processo, devem ocorrer a eliminação de agentes infecciosos por fagocitose, a redução progressiva do recrutamento de leucócitos e, finalmente, a apoptose dos leucócitos ativados (57, 65, 70-72).

A diminuição da migração de neutrófilos resulta do seguinte:

- Mudanças no padrão das citocinas inflamatórias (IL-1/IL-1Ra, TNF- $\alpha$ ) e citocinas anti-inflamatórias (IL-10, IL-4, IL-13)
- Retorno progressivo de células endoteliais para o estado de repouso, com regressão das moléculas de adesão
- Inativação de agentes quimiotáticos por enzimas específicas ou através de endocitose mediada por receptor (65, 70-72)

Outros mediadores importantes na redução do recrutamento de neutrófilos são as lipoxinas, produtos gerados pelo metabolismo intracelular durante a defesa do hospedeiro. Lipoxinas inibem a quimiotaxia de neutrófilos, adesão às células endoteliais e migração através do endotélio e do epitélio (57, 65, 70-72).

Além da redução de aporte de neutrófilos, a sua apoptose, seguida pela fagocitose por macrófagos, é o principal mecanismo de limpeza de neutrófilos recrutados para os locais de inflamação e, conseqüentemente, para promoção da resolução da inflamação (57, 65, 70-72).

A apoptose de neutrófilos envolve uma cascata de ativação de caspases. Alguns mediadores inflamatórios, tais como produtos bacterianos e GM-CSF, podem adiar a apoptose de neutrófilos, aumentando a estabilidade e reduzindo a atividade da caspase 3 (57, 65, 70-72).

Os macrófagos podem desencadear apoptose neutrofilica expressando em sua superfície celular o ligante-Fas (FasL) e liberando FasL solúvel, que reage com seu receptor específico nos neutrófilos, induzindo a apoptose (57, 65, 70-72).

Finalmente, a fagocitose de neutrófilos apoptóticos inibe a produção de IL-1beta, IL-8, IL-10, GM-CSF, TNF- $\alpha$ , leucotrieno C4 e tromboxano B2 pelos macrófagos humanos. Essa supressão de mediador inflamatório pode ser o principal



responsável para resolução das fases aguda e crônica da inflamação (57, 65, 70-72).

## **2 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS**

### **2.1 OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS**

Avaliar se as ligas metálicas constituintes dos stents Carotídeos são capazes, por si só, sem a presença de proteínas plasmáticas, de estimular a ativação inflamatória de neutrófilos. O grau dessa ativação desencadeada por stent da liga metálica de Nitinol e de cobalto-cromo foi comparado estaticamente. Também foi realizada a análise morfológica dos stents para identificar substratos que expliquem a diferença da ativação dos neutrófilos.

### 3. MÉTODO

#### 3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

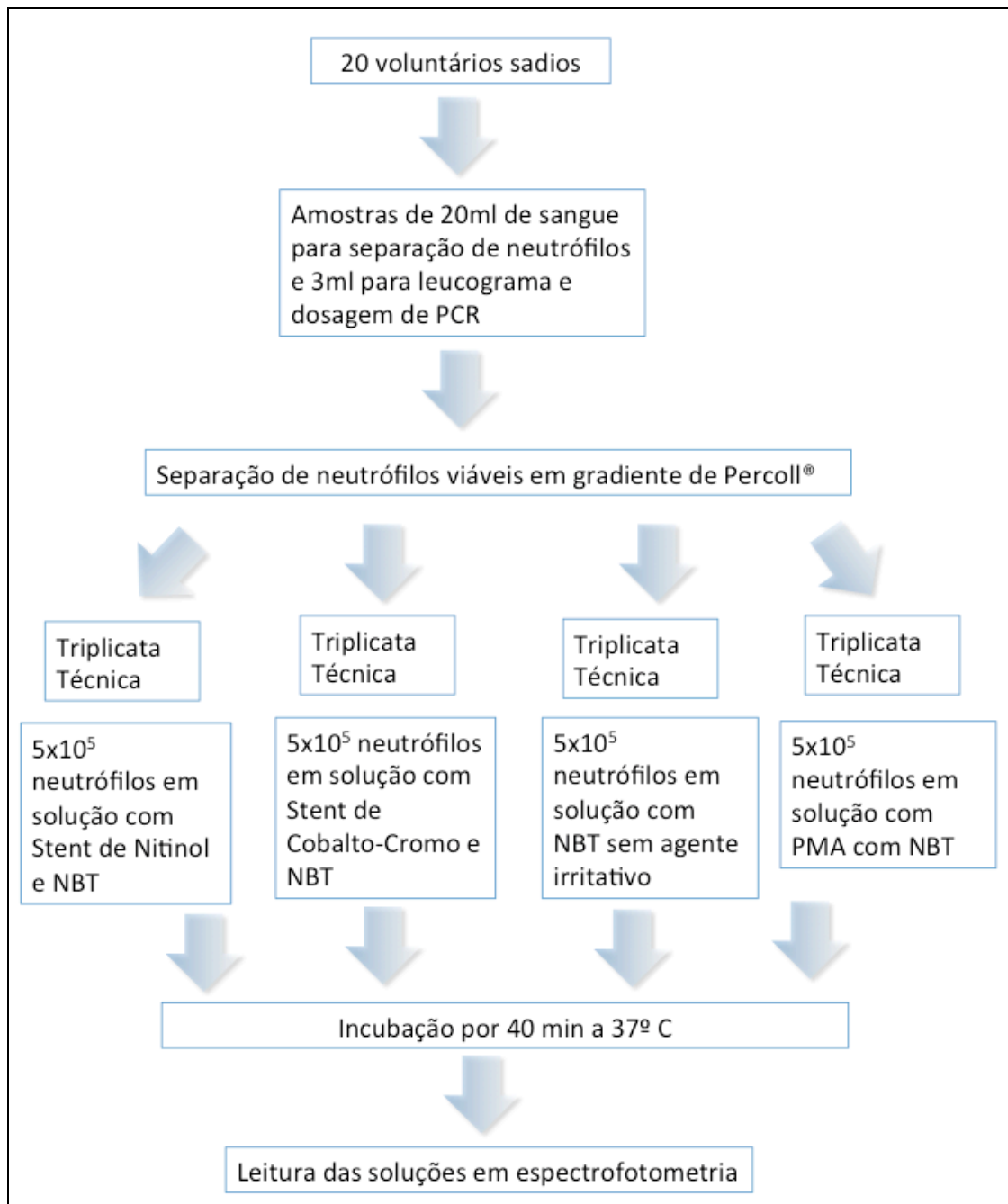


Figura 12. Desenho do estudo. Legendas: PCR: proteína C reativa; NBT: Nitro Blue Tetrazolium; PMA: 13-acetato de forbol éster 12-miristato

### 3.2 POPULAÇÃO DE ESTUDO

Vinte voluntários hígidos entre 20 a 40 anos foram incluídos neste ensaio clínico. Para inclusão, os voluntários deviam ser hígidos, do sexo masculino, não serem portadores de qualquer agravo à saúde crônico ou agudo, não apresentar histórico de qualquer doença inflamatória ou infecciosa ativa nos últimos 30 dias, não fazer uso de medicação crônica, não ter feito uso de anti-inflamatório, hormonal ou não, nos últimos 30 dias e não ter tido privação de sono ou libação alcoólica na última semana.

Uma amostra de 23 ml de sangue total foi coletada de cada indivíduo, sendo 20 ml alocados para separação de neutrófilos utilizando gradientes de Percoll®. O Percoll® é composto de partículas de sílica inerte e não tóxica que não aderem a membranas, sendo ideal para purificação de células e organelas (74, 75). Uma pequena amostra de sangue de 3 ml foi enviada para realização de leucograma e dosagem de proteína C reativa. As amostras foram enviadas ao laboratório de bioquímica e química de proteínas da UnB (LBQP), para separação dos neutrófilos, e ao laboratório de análise clínica da Universidade de Brasília (UnB), para os exames laboratoriais.

A coleta foi realizada com aspiração suave para não ativar os neutrófilos pelo choque mecânico e em material plástico estéril. A seringa utilizada foi heparinizada com 5 UI/ml, concentração menor que a usual, de 25 UI/ml. Essa concentração foi otimizada para evitar a coagulação sanguínea e a inibição da desgranulação e adesão dos neutrófilos (76).

Voluntários que não preencheram os critérios de inclusão ou apresentaram aumentos da leucometria ou da dosagem da proteína C reativa acima dos valores de referência foram excluídos do estudo.

### 3.3 PREPARAÇÃO DOS STENTS CAROTÍDEOS

Dois tipos de stents Carotídeos auto-expansivos foram utilizados para o experimento: um de liga metálica de cobalto-cromo (CoCr), *WallStent*® (Stryker,

Kalamazoo, MI) e outro de Nitinol (NT), *Protégé*® (Covidien, Irvine, CA). Os stents foram seccionados transversalmente em fragmentos de 10 mm para evitar a perda do trançado das malhas, e colocados em tubos de *Eppendorf*® (Figura 13).



Figura 13. Configuração do fragmento de stent no interior do tubo de Eppendorf®. À esquerda o stent de Cobalto-Cromo (WallStent®) e à direita o stent de Nitinol (Protégé®) (arquivo pessoal)

### 3.4 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

Todo o material utilizado na preparação das amostras era constituído de plástico estéril, e as soluções filtradas, por filtro de 0,22 µm. A separação foi realizada dentro do fluxo laminar, para evitar contaminação e consequente ativação dos neutrófilos (76).

A separação dos leucócitos e eritrócitos foi realizada utilizando gradientes de Percoll® (Healthcare, G.) com porcentagem e quantidades de reagentes listadas na tabela 4.

Tabela 4 – Gradiente de Percoll® montado para separação dos neutrófilos dos demais componentes sanguíneos. Legenda: HBSS - solução tampão de Hank

Reagente	60% (3 ml)	70% (3 ml)
Percoll® 100%	1800 µl	2100 µl
HBSS 1X	990 µl	645 µl
HBSS 10X	210 µl	255 µl

Foi realizada a montagem de dois gradientes, cada em um tubo de 15ml tipo Falcon®, da seguinte forma: 3 ml da solução de 70% adicionados ao fundo do tubo e, em seguida, mais 3 ml da solução de 60% inserida sobre a solução mais densa em cada. Esse procedimento é feito de forma lenta e cuidadosa, para que não haja mistura das soluções (74).

Após essa montagem, 3 ml de sangue bem homogeneizado na própria seringa foram colocados sobre o gradiente. Esse material foi levado para uma centrífuga refrigerada com a caçamba móvel Hitashi-Himac® SCR, na qual foi submetido a uma força gravitacional de 400 g na temperatura de 22° C, aceleração e desaceleração de índice 2, por 35 minutos (74).

Os resultados após a separação foram: os neutrófilos entre os gradientes de 70% e 60%, os eritrócitos no fundo do tubo, os mononucleares sobre o gradiente de 60% e o plasma sobre os mononucleares. Foi descartado o plasma, os mononucleares e aproximadamente 2 ml de gradiente, para garantir a pureza do material. Foram colhidos os neutrófilos (aproximadamente 2 ml) e colocados em outro tubo de 15 ml, onde foi feita a lavagem dos neutrófilos para retirar o excesso de Percoll®. Foram adicionados 7 ml de *Hank's balanced salt solution* 1x (solução tampão de Hank – HBSS) às células, e centrifugadas as amostras por 12 minutos na gravidade de 150 g, aceleração e desaceleração de índice 5 na temperatura de 22° C. HBSS apresenta pH entre 7,2 e 7,4; 0,4 g/l de cloreto de potássio; 0,06 g/l de fostato de potássio monobásico; 0,048 g/l de fosfato de sódio dibásico; 1 g/l de d-glicose; 11 mg/l de vermelho de fenol; e 0,35 g/l de bicarbonato de sódio, sendo considerado uma solução tampão ideal para experimentos em células vivas e viáveis (74-76). O sobrenadante foi descartado; foram acrescentados ao sedimento 5 ml de HBSS 1x, e repetiu-se a centrifugação anterior. Após essas duas lavagens, foi feita uma etapa de hemólise para retirar a contaminação com eritrócitos. Nesse procedimento, foram adicionados 3 ml de água MilliQ por 15 segundos e restaurou-

se a osmolaridade acrescentando-se 9 ml de NaCl 1,2%. Centrifugou-se a amostra por 12 minutos na gravidade de 150 g, aceleração e desaceleração de índice 5 na temperatura de 22° C. Descartou-se o sobrenadante e ressuspenderam-se os neutrófilos em 450 µl de tampão salina fostato com 0,9 mM de Ca<sup>2+</sup> e 0,5 mM de Mg<sup>2+</sup> em temperatura ambiente. Uma alíquota foi reservada para a contagem de células (Figura 14 e 15) (74, 76).

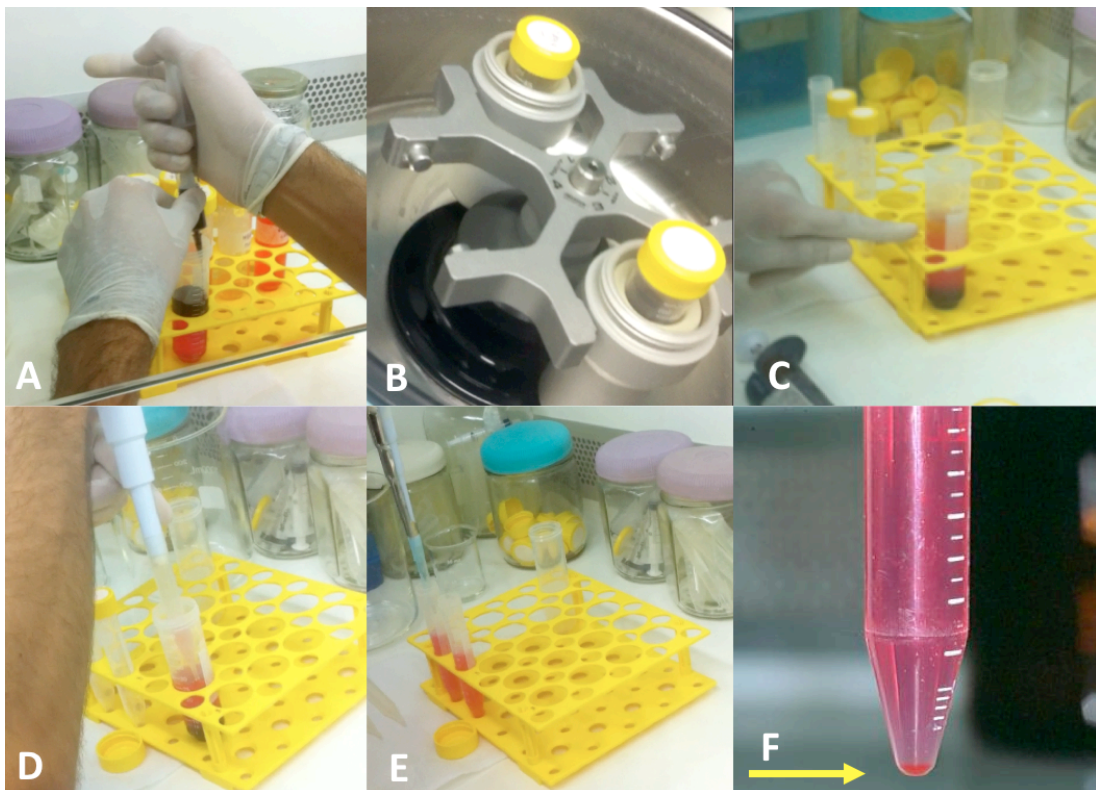


Figura 14. A) Colocação da amostra de sangue sobre o gradiente de Percoll®. B) Centrifugação da amostra no gradiente para realizar a separação. C) Aspecto após a separação: a primeira camada é constituída por plasma, plaquetas e demais leucócitos; a camada do meio é formada basicamente por neutrófilos e camada inferior, por eritrócitos. D) Coleta da camada de neutrófilos. E) Separação nos tubos para limpeza do Percoll® e hemólise. F) Pellet contendo neutrófilos (arquivo pessoal)

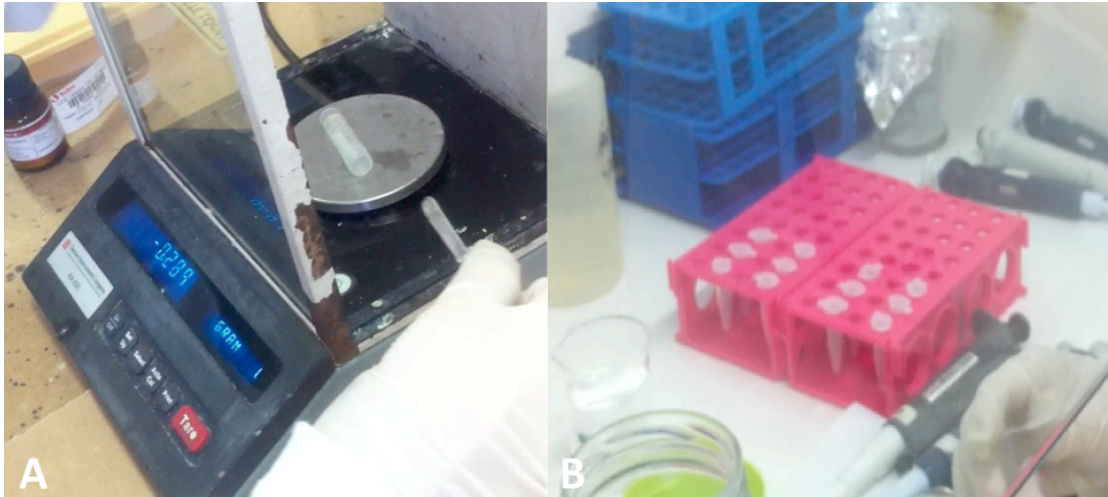


Figura 15. A) Aferição em balança de precisão 0,02  $\mu$ grama de NBT para confecção da solução; B) Disposição dos tubos tipo Eppendorf® para realização da triplicata técnica (arquivo pessoal)

A contagem das células foi realizada na câmara de Neubauer. Foram retirados 10  $\mu$ l da suspensão de neutrófilos, e adicionados 50 $\mu$ l de líquido de Turk, uma solução corante de material nucléico (74). Após a homogeneização, foram preenchidos os quadrantes da câmara de Neubauer e realizou-se a contagem imediatamente. Focalizou-se no aumento de 40X e foi feita a contagem nas regiões A, B, C e D, de acordo com a Figura 16 (74).

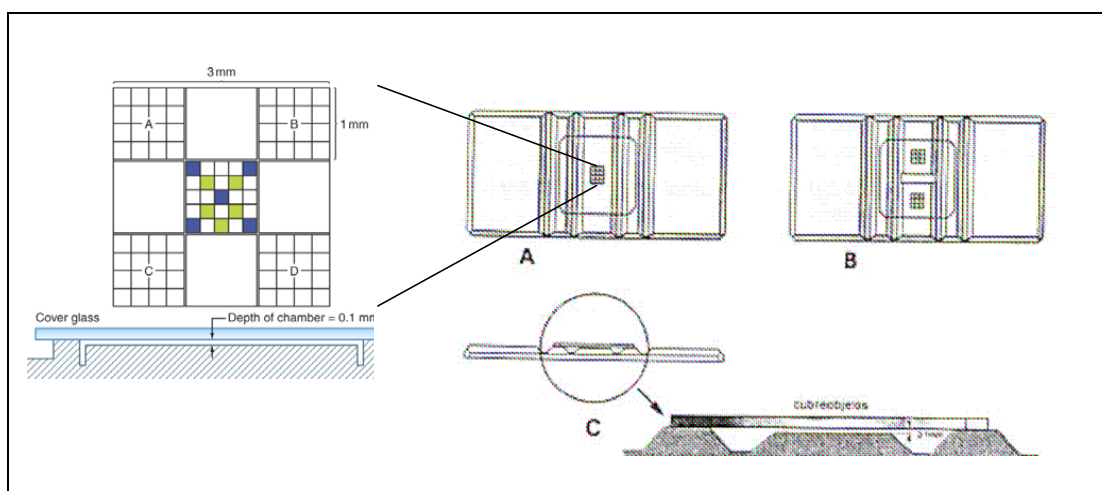


Figura 16. A) e B) Câmara de Neubauer com campos de leitura; C) Perfil da câmara de Neubauer (arquivo pessoal)



A área do quadrante mede 1 mm<sup>2</sup>. A profundidade da câmara é de 0,1 mm. Logo, ao contar quatro áreas (A, B, C e D), contou-se o número de células em 0,4 mm<sup>3</sup>, o que corresponde ao número de células em 0,4 µl. Multiplicou-se o resultado por 2,5 para saber o número de células por µl, além de multiplicar pelo fator de diluição (74).

Cálculo:  $2,5 \times 6 \times (A+B+C+D) = \text{número de células}/\mu\text{l}$

As amostras foram divididas em triplicata técnica (com intuito de minimizar o erro sistemático do método) em quatro grupos e incubadas a 37° C por 40 minutos (Figura 10 e Figura 13B). Os grupo foram:

- a) Controle negativo: tubo de Eppendorf com  $5 \times 10^5$  neutrófilos incubados com 50 µl de NBT (1 mg/ml; nitro blue tetrazolium)
- b) Controle positivo: tubo de Eppendorf com  $5 \times 10^5$  neutrófilos, 50 µl de NBT (1 mg/ml) e 5 µl de PMA (100 ng/ml; 13-acetato de forbol éster 12-miristato, um forte ativador dos neutrófilos *in vitro*)
- c) Liga metálica 1: tubo de Eppendorf com  $5 \times 10^5$  neutrófilos, 50 µl de NBT (1 mg/ml) e stent de NiTi
- d) Liga metálica 2: tubo de Eppendorf com  $5 \times 10^5$  neutrófilos, 50 µl de NBT (1 mg/ml) e stent de CoCr

O PMA é um éster de forbol análogo ao diacilglicerol, muito utilizado como controle positivo de ativação “*in vitro*” em experimentos com neutrófilos humanos (74). Esse agente induz diretamente uma liberação máxima de espécies reativas de oxigênio (74).

### 3.5 ANÁLISE FISIOLÓGICA DOS NEUTRÓFILOS

Após o período de incubação, os resultados foram mensurados em transmitância por espectrofotômetro óptico UV-1800 ® (Shimadzu, Kyoto, JP – figura 17), utilizando comprimento de onda de 550 nm, conforme técnica padrão.



Figura 17. Espectrofotômetro UV-1800 ® (Shimadzu, Kyoto) utilizado no experimento (arquivo pessoal)

Espectrofotometria é a medição quantitativa das propriedades de reflexão ou de transmissão de luz de um material, em função de um comprimento de onda (77, 78). Incide-se uma luz com um comprimento de onda conhecido e mensura-se a quantidade refletida (77, 78). (Figura 18)

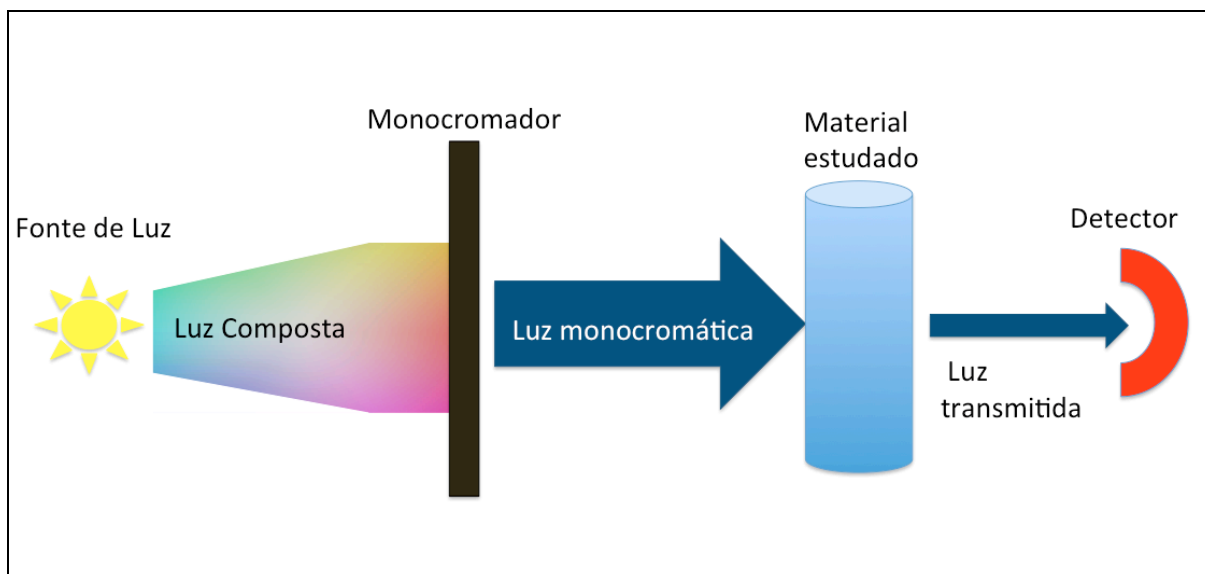


Figura 18 Desenho esquemático da espectrofotometria (Arquivo pessoal)

No método utilizado, as espécies reativas de oxigênio produzidos pelos neutrófilos reagem com NBT, reduzindo-o em um composto chamado de formazan (Figura 19) (77). Com isso, o NBT perde sua coloração natural amarelada e passa para coloração púrpura do formazan, idealmente lida em espectrofotometria com o comprimento de onda de 550 nm (77).

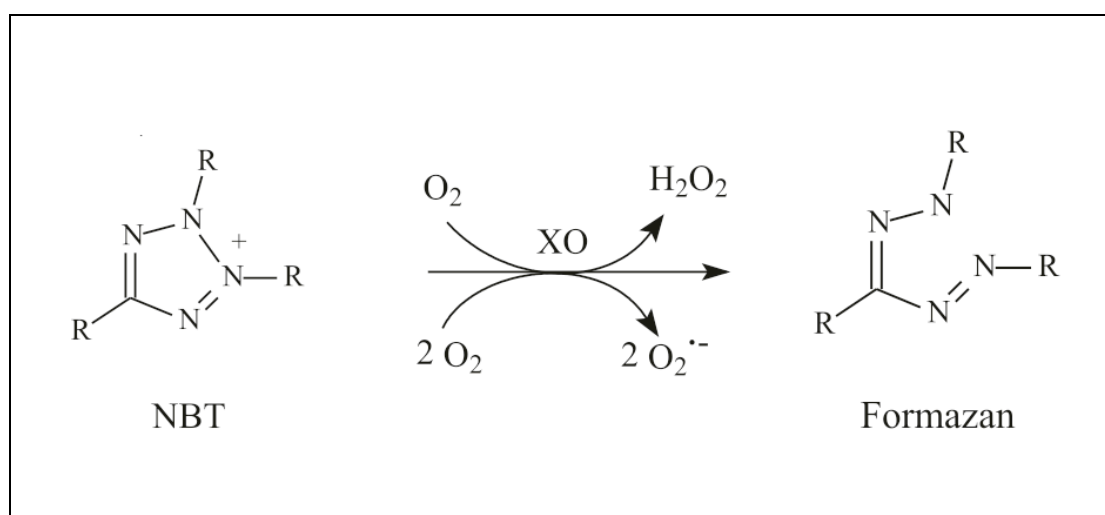


Figura 19 Redução do NBT em formazan por ação oxidativa das espécies reativas de oxigênio (77)

### 3.6 ANÁLISE ESTRUTURAL DOS STENTS

Uma amostra de cada SC após a leitura no espectrofotômetro foi analisada em microscopia eletrônica de varredura (MEV) modelo JEOL JSM 7001F. As imagens foram registradas em forma de fotografia. Não houve nenhum preparo das amostras, tendo sido elas levadas diretamente ao equipamento; não se realizou a etapa de metalização. A incidência do feixe eletrônico com as amostras foi de zero grau, e a voltagem de aceleração foi de 15 KV, conforme técnica padrão (79, 80).

Foram analisadas a conformação da malha de cada SC e as características dos neutrófilos aderidos.

### 3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA E CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Foram calculadas as médias aritméticas das triplicatas técnicas para as soluções expostas ao stent de CoCr, ao stent de NiTi, para soluções de controle negativo (sem ativador inflamatório) e para soluções de controle positivo (solução com PMA) e comparadas entre si. O *software* utilizado para a análise estatística foi Statplus Professional® 2009 (<http://www.analystsoft.com/en/products/statplus/>), com os testes t de Student, considerando estatisticamente significativo o  $p$  menor que 0,05.

O estudo está de acordo com a resolução 06/96 sobre pesquisa em seres humanos e foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisas (CEP) da UnB (Anexo A).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 AFERIÇÃO DE PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO POR ESPECTROFOTOMETRIA ÓPTICA

A aferição dos neutrófilos isolados da cada voluntário foi realizada em triplicata (n=20,) e dividida em: três soluções com fragmentos de stent de NiTi, três soluções com stent CoCr, três soluções com controle positivo e três soluções com controle negativo, com um total de 60 leituras na espectrofotometria para cada uma das quatro soluções (tabela 5).

A média aritmética das triplicatas de cada amostra foi feita, sendo esse o valor utilizado para realização da análise estatística. Além disso, os valores referentes a um voluntário (voluntário 11 da tabela 5) foram excluídos, em virtude desse voluntário apresentar a dosagem de PCR acima da normalidade, sugerindo quadro infeccioso ou inflamatório ativo.

Tabela 5 – Leitura no espectrofotômetro em transmitância de todas as soluções das triplicatas técnicas estudadas (continua)

Amostras	Stent de CoCr	Stent NiTi	Controle negativo	Controle positivo
1	0,087	0,047	0,038	0,151
1	0,069	0,060	0,056	0,145
1	0,054	0,056	0,044	0,148
2	0,109	0,112	0,057	0,200
2	0,079	0,114	0,067	0,200
2	0,134	0,136	0,066	0,161
3	0,021	0,064	0,028	0,163
3	0,042	0,027	0,025	0,159
3	0,048	0,034	0,000	0,172
4	0,107	0,052	0,040	0,205
4	0,080	0,078	0,032	0,227
4	0,050	0,289	0,029	0,206
5	0,107	0,113	0,057	0,189
5	0,080	0,114	0,067	0,200
5	0,136	0,120	0,066	0,161
6	0,062	0,021	0,029	0,158
6	0,026	0,030	0,027	0,164
6	0,034	0,047	0,000	0,147

Tabela 5 – Leitura da espectrofotometria em transmitância de todas as soluções das triplicatas técnicas estudadas (conclusão)

Amostras	Stent de CoCr	Stent NiTi	Controle negativo	Controle positivo
7	0,049	0,106	0,040	0,202
7	0,048	0,080	0,032	0,226
7	0,036	0,061	0,028	0,217
8	0,109	0,147	0,070	0,300
8	0,114	0,123	0,086	0,322
8	0,187	0,213	0,073	0,230
9	0,003	0,038	0,025	0,159
9	0,038	0,017	0,022	0,089
9	0,022	0,032	0,014	0,091
10	0,264	0,042	0,262	0,383
10	0,165	0,458	0,116	0,142
10	0,115	0,100	0,088	0,146
11	0,053	0,283	0,061	0,337
11	0,054	0,260	0,087	0,243
11	0,062	0,219	0,046	0,246
12	0,004	0,039	0,026	0,148
12	0,038	0,017	0,023	0,089
12	0,023	0,032	0,014	0,093
13	0,067	0,165	0,048	0,180
13	0,085	0,136	0,125	0,176
13	0,082	0,166	0,047	0,200
14	0,267	0,043	0,261	0,337
14	0,160	0,044	0,117	0,143
14	0,119	0,102	0,086	0,146
15	0,071	0,168	0,048	0,180
15	0,087	0,137	0,132	0,175
15	0,081	0,164	0,047	0,201
16	0,182	0,152	0,076	0,105
16	0,148	0,227	0,090	0,125
16	0,141	0,162	0,071	0,154
17	0,041	0,089	0,031	0,115
17	0,048	0,112	0,026	0,127
17	0,046	0,150	0,025	0,187
18	0,044	0,089	0,031	0,115
18	0,051	0,113	0,027	0,127
18	0,049	0,150	0,026	0,187
19	0,047	0,056	0,050	0,040
19	0,096	0,377	0,047	0,108
19	0,024	0,140	0,046	0,068
20	0,049	0,040	0,049	0,056
20	0,048	0,110	0,097	0,365
20	0,046	0,068	0,025	0,142

Os maiores valores médios das leituras (0,171 +/- 0,048) foram encontrados no grupo do controle positivo, seguindo-se em ordem decrescente pelo grupo de NiTi (0,115 +/- 0,058), CoCr (0,081 +/- 0,050) e, os controles negativos (0,057 +/- 0,039) (tabela 6 e figura 20).

Tabela 6 – Resultados obtidos na espectroscopia em transmitância com comprimento de onda de 550 nm e os valores laboratoriais de leucometria e proteína C reativa obtidos para cada amostra

Amostra	Stent de CoCr	Stent NiTi	Controle negativo	Controle positivo (PMA)	Leucometria (mm <sup>3</sup> )	Proteína C reativa (mg/dl)
1	0,070	0,054	0,046	0,148	0,070	0,054
2	0,107	0,121	0,064	0,187	0,107	0,121
3	0,037	0,042	0,018	0,165	0,037	0,042
4	0,079	0,140	0,034	0,213	0,079	0,140
5	0,108	0,116	0,064	0,183	0,108	0,116
6	0,041	0,033	0,019	0,157	0,041	0,033
7	0,044	0,082	0,033	0,215	0,044	0,082
8	0,137	0,161	0,076	0,284	0,137	0,161
9	0,021	0,029	0,020	0,113	0,021	0,029
10	0,181	0,200	0,155	0,224	0,181	0,200
11	0,022	0,029	0,021	0,110	0,022	0,029
12	0,078	0,156	0,073	0,186	0,078	0,156
13	0,182	0,197	0,155	0,209	0,182	0,197
14	0,080	0,156	0,075	0,185	0,080	0,156
15	0,157	0,180	0,079	0,128	0,157	0,180
16	0,045	0,117	0,027	0,143	0,045	0,117
17	0,048	0,117	0,028	0,143	0,048	0,117
18	0,056	0,191	0,047	0,072	0,056	0,191
19	0,048	0,073	0,057	0,188	0,048	0,073
Média	0,081	0,115	0,057	0,171	9,073	0,22
Desvio padrão	+/- 0,050	+/- 0,058	+/- 0,039	+/- 0,048	+/- 1,137	+/- 0,05

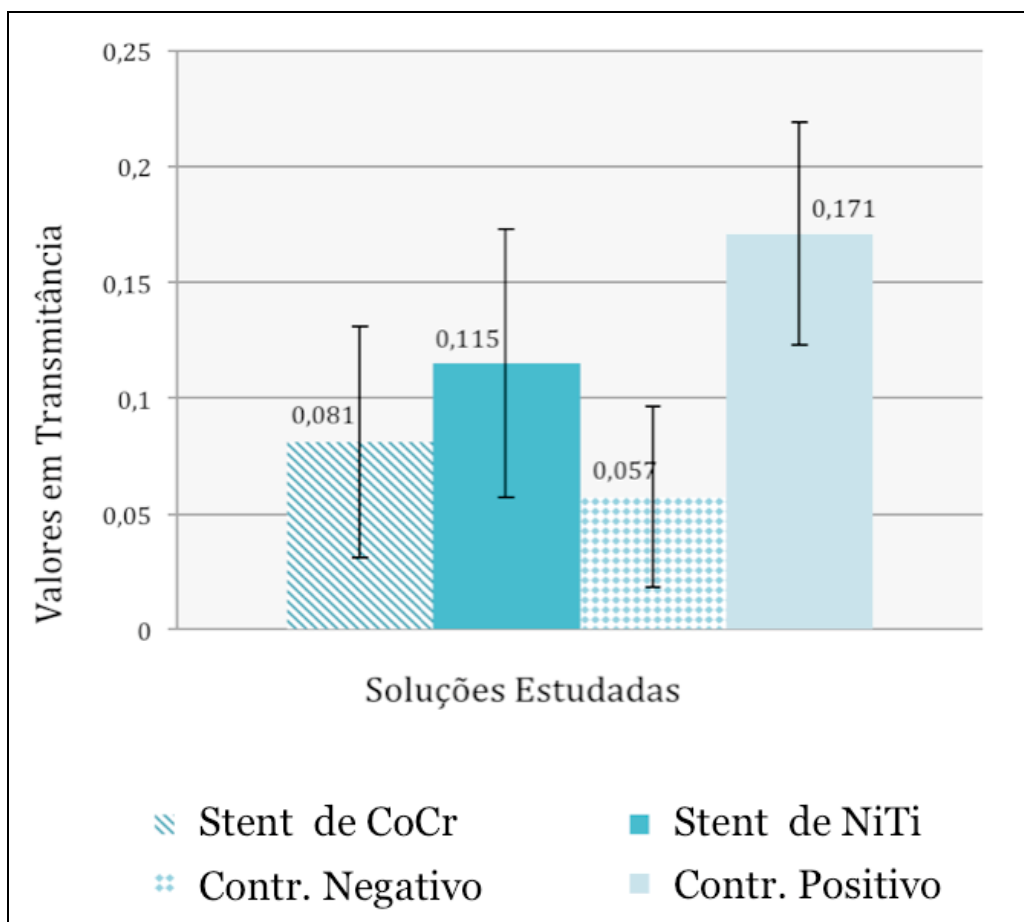


Figura 20. Média dos valores de transmitância obtidos pela análise em espectrofotometria das amostras dos quatro grupos. Soluções com stent de CoCr e NiTi apresentaram maior produção de espécies reativas de oxigênio quando comparados com as soluções de controle negativa ( $p < 0,0001$ , com IC95% 0,0152 a 0,0320 e  $p < 0,0001$ , com IC95% 0,0324 a 0,0835 para os stents de CoCr e NiTi, respectivamente). A soluções com stent de NiTi apresentaram maior produção de espécies reativas de oxigênio que a soluções com stent de CoCr ( $p = 0,002$  e IC95% 0,00052 a 0,0534).

A análise estatística, realizada com teste t de Student, evidenciou que ambos os tipos de SC estudados ativaram significativamente os neutrófilos expostos em solução quando comparados ao controle negativo, com valores de  $p < 0,0001$  (IC95% 0,0152 a 0,0320) e  $p < 0,0001$  (IC95% 0,0324 a 0,0835) para os stents de CoCr e NiTi, respectivamente (Tabela 7).

A comparação entre os tipos de stents carotídeos evidenciou grau de reatividade significativamente maior da liga metálica de NiTi em relação à de CoCr ( $p = 0,002$  e IC95% 0,00052 a 0,0534) (Tabela 7).



Tabela 7 – Valores da análise estatística da comparação entre as amostras utilizando o teste t

	Stent de CoCr	Stent de NiTi	Controle negativo	Controle positivo
Stent de CoCr	-	p = 0,002 (IC95% 0,0005 a 0,0534)	p < 0,0001 (IC95% 0,015 a 0,032)	p = 0,0088 (IC95% 0,007 a 0,108)
Stent de NiTi	p = 0,002 (IC95% 0,0005 a 0,0534)	-	p < 0,0001 (IC95% 0,032 a 0,083)	p = 0,0006 (IC95% 0,086 a 0,025)
Controle negativo	p < 0,0001 (IC95% 0,015 a 0,032)	p < 0,0001 (IC95% 0,0324 a 0,0835)	-	p < 0,0001 (IC95% 0,098 a 0,129)
Controle positivo	p = 0,009 (IC95% 0,007 a 0,108)	p = 0,0006 (IC95% 0,086 a 0,025)	p < 0,0001 (IC95% 0,098 a 0,129)	-

#### 4.2 ANÁLISE ESTRUTURAL EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Os achados da microscopia eletrônica de varredura sugerem que a malha do stent de NiTi apresenta uma secção transversal retangular; já para o stent de CoCr sugere que apresenta uma secção transversal cilíndrica. Não foram realizadas imagens em número suficiente para análise estatística das alterações morfológicas específicas dos neutrófilos (Figura 21).

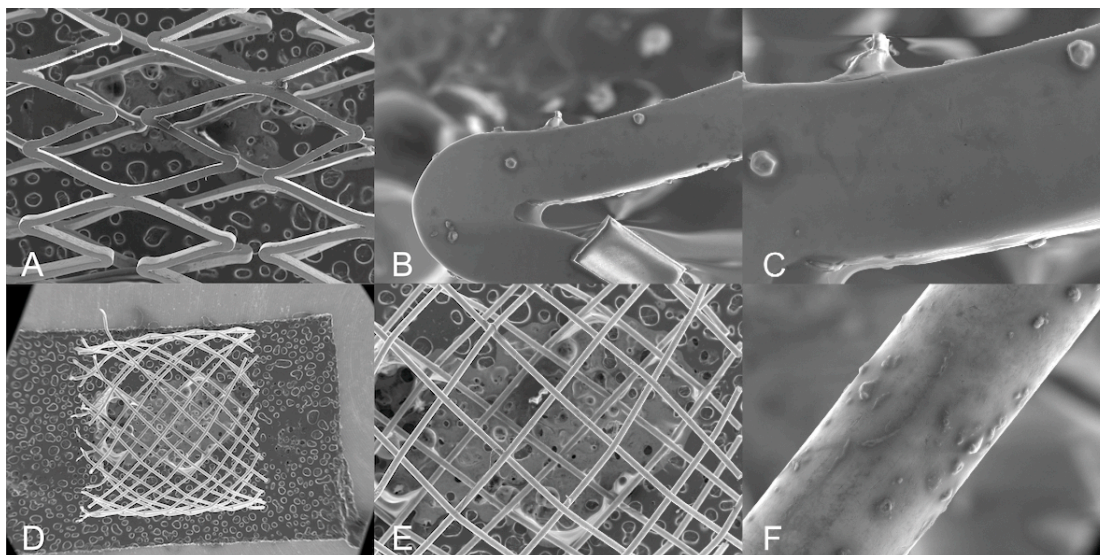


Figura 21 Imagens de microscopia eletrônica de varredura: A) SC de NiTi com aumento de 23X; B) SC de NiTi com aumento de 200X, no qual se observa a secção transversal retangular da malha; C) SC de NiTi com aumento de 500X, no qual se observam neutrófilos aderidos à malha; D) SC de CoCr com aumento de 10X; E) SC de CoCr com aumento de 23X, no qual se observa a secção cilíndrica da malha; F) SC de CoCr com aumento de 500X, no qual se observa com melhor definição a secção transversal e a presença de neutrófilos aderidos à malha

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 RESISTÊNCIA À CORROSÃO

A perpetuação por longo prazo da resposta inflamatória fisiológica após a lesão endotelial no ato de implantação do stent parece ser o cerne do processo patológico que culminará na hiperplasia da camada muscular e, conseqüentemente, na proliferação neo-intimal (65, 68, 70). Além dos fatores individuais genéticos, o ambiente inflamatório das placas ateromatosas e, principalmente, a resposta inflamatória crônica de corpo estranho são os principais responsáveis pela manutenção da resposta inflamatória (64, 65, 67, 68, 70).

Em nosso estudo, optamos por utilizar a ativação dos neutrófilos para avaliar a resposta imunológica aos stents carotídeos. As principais razões para utilização dos neutrófilos foram:

- É a célula inflamatória mais numerosa na corrente sanguínea, perfazendo cerca de 70% do exército imunitário (65).
- É a primeira célula a chegar ao sítio inflamatório agudo, atuando nesse contexto como célula efetora e, agora de forma bem documentada, como célula reguladora da resposta inflamatória aguda (65).
- Desempenha talvez o papel regulatório mais importante na resolução da fase aguda da resposta inflamatória, inicializando e terminando a fase crônica, por meio de controle na ativação e apoptose dos macrófagos (65, 71).
- Em virtude das próteses vasculares estarem em íntimo contato com os elementos sanguíneos (proteínas e células) e não no interstício, a fase crônica da resposta de corpo estranho nunca se torna classicamente caracterizada, com formação da cápsula fibrótica (58, 65, 71). Assim, a prótese mantém contanto contínuo com elementos protéicos sanguíneos, criando uma fase crônica de resposta ao corpo estranho com características híbridas da fase aguda, mantendo os neutrófilos como células altamente ativas (58, 65, 71).

Essa ativação inflamatória da prótese está inversamente associada à sua característica de biocompatibilidade. Logo, em última análise, espera-se que, quanto maior for a biocompatibilidade do stent utilizado, menor será a resposta inflamatória de corpo estranho desencadeada e, conseqüente, menores serão as taxas de reestenoses tardias por proliferação neo-intimal (49, 55, 56).

A biocompatibilidade, por sua vez, é dependente da resistência à corrosão e da toxicidade dos subprodutos liberados pelas ligas metálicas (41-45). Atualmente, acredita-se que o principal fator responsável pela biocompatibilidade seja a resistência à corrosão dos materiais (41-45). Em relação a esse ponto, os inúmeros ensaios laboratoriais evidenciam que a liga de NiTi é a liga de maior biocompatibilidade entre as duas estudadas (41-45, 83-90). Assim, esperávamos que houvesse menor produção de espécies reativas de oxigênio pelas células expostas ao stent de NiTi. No entanto, obtivemos exatamente o oposto em nosso estudo: a liga de NiTi foi estatisticamente mais reativa que a liga de CoCr ( $p = 0,002$ ) (Figura 20).

Diferentemente dos demais ensaios de Biocompatibilidade, acreditamos que a resistência à corrosão tenha se tornado um fator secundário em nosso estudo. No processo de separação dos neutrófilos, foi desprezado o plasma, juntamente com suas proteínas. A corrosão dos SC, quando expostos ao plasma, ocorre seguindo as características do tipo galvânica, em que, após a ruptura da camada de óxido protetora, ocorre a exposição de íons metálicos carregados negativamente. As proteínas plasmáticas, quando em contato com esses íons, recebem sua carga negativa, mudando sua conformação para a forma ativada (45-49).

Os neutrófilos já previamente sensibilizados pelas citocinas e produtos do ciclo araquidônico liberados pelo trauma endotelial na implantação do stent interagem com as proteínas plasmáticas aderidas ao stent, desencadeando toda a cascata inflamatória (45-49, 57, 64). Assim, em nosso estudo, foi retirado tanto as proteínas plasmáticas, quanto as proteínas de pré-ativação neutrofílica do endotélio.

Dessa forma, acreditamos que a segunda propriedade da biocompatibilidade, a liberação de íons metálicos e nanopartículas, tenha sido o fator preponderante em nosso estudo.

Algumas evidências indicam que até mesmo *in vivo* a liberação desses subprodutos possa desempenhar um papel mais importante que o até hoje relatado (45-49, 81). A real corrosão dos materiais *in vivo* ainda é motivo de certa dúvida.

Sabe-se que ela não apresenta a mesma velocidade e intensidade que os modelos *in vitro* (81). Através de modelos laboratoriais *in vitro*, observou-se taxa de corrosão de 0,046 milímetros/ano para o NiTi; assim, os fios de Nitinol de 0,2 mm de diâmetro, que constituem a malha dos stents, se dissolveriam em cerca de 4 a 5 anos, o que definitivamente não é observado (81). Outro ponto obscuro é o quanto a liberação de produtos iônicos depende ou não da corrosão da liga metálica (89-96).

## 5.2 LIBERAÇÃO IÔNICA

As ligas metálicas liberam progressivamente resíduos iônicos e não iônicos tóxicos, mesmo na ausência de qualquer sinal químico ou visual de corrosão (81-96). De fato, a atividade corrosiva sobre a liga acelera de forma considerável a liberação desses produtos (41, 42, 45, 47, 91, 92). Contudo, a concentração de cada elemento na liga parece ser o fator principal na taxa de liberação dos íons metálicos, em especial nas primeiras horas em solução (91,92). Por exemplo: a liga de CoCr utilizada no estudo apresenta cerca de 35% de níquel em sua composição, enquanto a liga de Nitinol em questão apresenta cerca de 54,1% de níquel (Tabela 9) (41, 42, 45, 47, 91, 92). Estudos *in vitro* evidenciaram que ocorre liberação de níquel em soluções tampões tanto pelas ligas de CoCr quanto pelas ligas de NiTi. Nesta última, a liberação é mais intensa e precoce, já ocorrendo nas primeiras horas, tornando-se semelhante após alguns dias (41, 42, 45, 47, 91, 92). Dessa forma, optamos por analisar os efeitos adversos que apresentam a maior diferença de concentração em cada liga, ou seja, o Ni (54,1% na liga NiTi contra 35% na liga CoCr), o Co (0,64% na liga NiTi contra 31% na liga CoCr), o Cr (0,76% na liga NiTi contra 20% na liga CoCr) e o Ti (42,9% na liga NiTi contra 1% na liga CoCr) (Tabela 8). (45)

Tabela 8 – Distribuição padrão dos elementos metálicos nas duas ligas estudadas (45)

Elementos	NiTi (%)	CoCr (%)
Ni	54,1	35
Co	0,64	31
Cr	0,76	20
Mn	0,64	0,15
Fe	0,66	1,0
Ti	42,9	1,0
Outros	—	10,0

Os efeitos da liberação de íon de níquel (Ni) sobre as células animais já foram bem documentados em estudos experimentais. Contudo, seu real efeito nas células humanas ainda é motivo de debate (86, 90, 92-95). Estudos em linfócitos de ratos evidenciaram que a liberação inicial em pequenas doses de Ni é capaz de estimular a proliferação e estimulação de linfócitos (86, 90, 92-95). Contudo, com o progressivo aumento da concentração de Ni na solução, o comportamento se inverte, suprimindo completamente a proliferação e até mesmo levando a apoptose (86, 90, 92-95). Os linfócitos de ratos expostos diretamente na superfície de NiTi poroso também apresentam o comportamento semelhante acima: inicialmente, observa-se a proliferação celular, seguida de sua supressão e apoptose (86, 90, 92-95). Nos poucos estudos com células humanas, evidenciou-se que quando expostos às superfícies de liga Nitinol ocorre leve estimulação da proliferação de linfócitos humanos (86, 90, 92-95).

Mesmo assim, acredita-se que a concentração plasmática de Ni decorrente da liberação por um implante de Nitinol provavelmente não ultrapassaria as concentrações naturais de Ni no soro de sangue humano (1 a 100 µg/l), o que provavelmente restringe seus efeitos localmente (86, 90, 92-95). Efeitos tóxicos e apoptóticos de Ni são observados nas concentrações de  $4 \times 10^3$  a  $9 \times 10^3$  µg/l, o que provavelmente só é observado nas primeiras horas e ao redor do implante. Outro dado importante é que indivíduos sensíveis ao níquel podem responder à concentração de níquel em faixa tão baixa quanto  $3 \times 10^3$  µg/l (86, 90, 92-95). Além de alterar o comportamento dos linfócitos, vários relatos de estimulação de proliferação de células de músculo liso foram observados (86, 90, 92-95). Em baixas concentrações de Ni (970 µg/l), não houve supressão da replicação de células musculares, mas sim uma ligeira estimulação; já concentrações superiores a 9000 µg/l evidenciaram importante supressão (86, 90, 92-95). Podemos inferir que a alta concentração presente logo após a implantação de um stent de NiTi pode suprimir a proliferação da camada muscular do vaso (passo fundamental para re-estenose neo-endotelial). Porém, as pequenas concentrações liberadas tardiamente podem ser mais um contribuinte para a proliferação das células musculares e, conseqüentemente, endoteliais. Infelizmente, não realizamos a dosagem dos íons metálicos após a incubação em nossas soluções. Esse dado poderia corroborar com a hipótese de a liberação do íon níquel ser responsável pela ativação neutrofílica.

Obviamente, além do íon Ni, outros íons metálicos são liberados pelos implantes quando submersos em solução. Elementos como Si, Cr, Fe, Co, Ni, Zn e Mo, estão presentes em várias quantidades na maior parte dos implantes. No entanto, existem poucos relatos de toxicidade ou eventos adversos pela liberação desses elementos, em especial dos quatro mais abundantes na ligas metálicas de nosso estudo: Ni, Ti, Co, Cr (92-96).

Realizando uma breve análise comparativa entre os quatro íons, com relação à carcinogênese, os elementos de nosso estudo (Co, Cr, Ni e Ti) são quatro dos dez elementos considerados mais cancerígenos (89-96). Entretanto, as ações alérgicas, tóxicas e carcinogênicas dos elementos metálicos no corpo dependem da forma química de apresentação desses elementos (84, 86-89, 91). Assim, o Cr(VI) é cancerígeno, enquanto o Cr(III) não aparenta ser; o Ni na forma cristalina é 100% cancerígeno, mas o tipo amorfo não é (84, 86-89, 91). Inúmeros estudos já evidenciaram que não há a liberação de Cr(VI) e Ni na forma cristalina pelos bioimplantes (84, 86-89, 91). Já a forma Cr(III) e cromo metálica, identificadas tardiamente na urina de pacientes com prótese articulares, ainda carecem de evidências com relação à genotoxicidade (84, 86-89, 91). Com relação ao cobalto, estudos evidenciam uma capacidade semelhante de reação idiossincrática, no entanto, apenas quando associado a carbetos, o que é praticamente restrito à exposição industrial do cobalto (84, 86-89, 91). Existem poucos relatos na literatura que podem atribuir as reações adversas exclusivamente ao cobalto das próteses (84, 86-89, 91).

Os principais relatos de ativação inflamatória das ligas de CoCr são feitos de próteses ortopédicas tipo metal-com-metal. Esse tipo de prótese sofre constantemente atrito entre os componente metálicos, ocasionando pequenas abrasões da superfície da liga e liberação de partículas de CoCr em diferentes tamanhos (84, 86-89, 91). Estudos evidenciaram que, quanto menor essas partículas, maior é a capacidade de ativação de macrófagos, formação de radicais livres e desencadeamento de resposta inflamatória persistente e lesiva (84, 86-89, 91). Apesar de termos criado pequenas lacerações ao cortar as malhas metálicas não acreditamos que tenha sido formado quantidade suficiente para ativação neutrofílica, já que os estudos relataram esse tipo de reação após 6 meses da implantação da prótese articular e após a formação de no mínimo uma área de 1cm<sup>2</sup> de laceração (extremamente superior à área do nosso estudo) (89, 91). Além disso,

esses estudos analisaram macrófagos, que são células especializadas em fagocitar grandes fragmentos (89, 91). Em nosso estudo, utilizamos neutrófilos, células pequenas, capazes de fagocitar fragmentos com dimensões de 0,5 a 5µm (49).

Outra ação patológica de Ni, Co e Cr no organismo está relacionada à sua capacidade de causar alergias de contato (84, 86-89, 91, 92, 95). Nesse aspecto, o Ni é o mais importante dentre esses (85, 91, 92, 95). A maioria dos dados acumulados sobre essa questão está relacionada à exposição profissional e civil (contato da pele com joias), havendo respostas inflamatórias idiossincráticas tipo I (sensibilização) e IV (sem sensibilização) (85, 91, 92, 95). Há ainda um volume crescente de relatos e evidências que indicam reação de hipersensibilização com a exposição médica, tanto em implantes odontológicos quanto em tecido profundo exposto a implantes com Ni (85, 91, 92, 95). Há casos de reação alérgica grave a fio de Nitinol ortodôntico em pacientes alérgicos a Ni (85, 91, 92, 95). O mecanismo de desencadeamento dessas reações ainda não está completamente claro, mas o fato de haver reações sem sensibilização prévia indica que o Ni pode estimular diretamente o sistema imunológico por meio de receptores ainda não identificados, o que justificaria os resultados aqui obtidos (85, 91, 92, 95).

Como relatado, o Co também é conhecido pela capacidade de causar dermatite de contato, porém, com frequência e intensidade inferior ao Ni (84, 86, 91). Os relatos até o momento indicam a necessidade de sensibilização prévia ou associação com carbeto (restrito a atividade industrial) para esses acontecimentos (84, 86, 91). Uma série de 14 casos relatou necrose óssea ao redor de próteses ortopédicas de Co. Nove desses casos aconteceram em pacientes previamente sensibilizados ao Co (84, 86, 91). Tendo em vista que em nosso estudo todas as proteínas foram desprezadas, inclusive as imunoglobulinas, consideramos pouco provável que a diferença da liberação de Co seja o responsável pelos nossos resultados.

Os íons de titânio (Ti) também são liberados pela liga de NiTi. Essa liberação de Ti pelo Nitinol é cerca de 10.000 vezes menor que a liberação de Ni (90, 92). O Ti é conhecido como o metal mais biocompatível em relação à atividade inflamatória do hospedeiro; entretanto, muito pouco se sabe sobre sua distribuição normal e seu comportamento em tecidos vivos (90, 92). Existem poucas evidências com relação aos efeitos tóxicos do Ti dissolvido no corpo humano, como a indução de liberação de citocinas potencialmente osteolíticas e como reações inflamatórias teciduais

contra implantes de Ti puros (90, 92). Novamente, a irritabilidade direta do Ti não parece ter sido a causa de nossos resultados, haja visto a carência de evidências científicas de sua irritabilidade.

### 5.3 ANÁLISE ESTRUTURAL DAS LIGAS

Comparando as superfícies das duas malhas pelas imagens por microscopia de varredura realizada durante nosso estudo, podemos inferir que a malha do stent de NiTi apresenta secção transversal retangular, enquanto o stent de CoCr apresenta secção transversal cilíndrica (Figura 21). Existem poucos estudos comparativos relacionando a ativação dos neutrófilos e a superfície de contato, porém há tendência para maior ativação em superfícies irregulares ou afiladas (97-99). Tais características poderiam corroborar para maior ativação neutrofílica pelo stent de NiTi, porém, não foram realizadas imagens suficientes para realização de uma apropriada de análise estatística. Estudos de superfície com espectroscopia (X-ray Photoelectron Spectroscopy e Auger electron spectroscopy) também evidenciaram que superfícies mais irregulares e afiladas acarretam menor camada de  $TiO_2$  (Figura 19), levando a maior perda de íons de níquel (97-99).

Apesar de o comportamento de uma liga metálica em solução ou mesmo no plasma sanguíneo ser muito mais complexo que a interação direta de apenas um íon metálico com os leucócitos, acreditamos que a maior concentração de Ni na liga de NiTi e a conformação retangular da secção transversal pode estar associado a maior e mais precoce liberação de íons Ni, o que, levando em consideração os inúmeros relatos de sua irritabilidade direta para células imunológicas, seria o mais provável responsável para maior ativação neutrofílica pelas ligas de NiTi, mesmo tendo o NiTi maior resistência à corrosão e reconhecida maior biocompatibilidade.



## 6 CONCLUSÃO

A ativação morfofisiológica de neutrófilos *in vitro* expostos aos stents carotídeos de Cobalto-Cromo e Nitinol evidenciou peculiaridades inerentes à cada liga metálica, com o nitinol sendo significativamente mais reativo. Este resultado parece estar relacionado à maior liberação inicial de níquel iônico pela liga de Nitinol, contudo, estudos posteriores, utilizando modelos *in vivo* são necessários para avaliar estes achados.

A avaliação dos mecanismos envolvidos neste tipo de reação inflamatória pode colaborar de maneira significativa para a compreensão das reações inflamatórias tardias tipo corpo estranho possibilitando medidas que possam interferir nos processos de re-estenose carotídea pós angioplastia com stent.

As duas ligas se mostraram capazes de ativar a formação de radicais livres pelos neutrófilos em apenas 40 minutos de exposição em solução tampão, quando comparadas com controle negativo. Apesar de ter maior resistência a corrosão, a liga de Nitinol apresentou maior reatividade estatística que a liga de Cromo-Cobalto. Outros estudos são necessário para avaliar a real importância dessa diferença inicial com relação a re-estenose tardia dos stents Carotídeos.

## REFERÊNCIAS

- 1 Naylor AR. What is the current status of invasive treatment of extracranial carotid artery disease? *Stroke*. 2011 Jul; 42(7):2080-5.
- 2 Daly C, Rodriguez HE. Carotid artery occlusive disease. *Surg Clin North Am*. 2013; 4:813-32.
- 3 de Weerd M, Greving JP, Hedblad B, et al. Prevalence of asymptomatic carotid artery stenosis in the general population: an individual participant data meta- analysis. *Stroke*. 2010; 41:1294-7.
- 4 Zarins CK, Giddens DP, Bharadvaj BK, et al. Carotid bifurcation atherosclerosis; quantitative correlation of plaque localization with flow velocity profiles and wall shear stress. *Circ Res*. 1983; 53:502-14.
- 5 Brott TG, Halperin JL, Abbara S, Bacharach JM, Barr JD, Bush RL et al. 2011 ASA/ ACCF/ AHA/ AANN/ AANS/ ACR/ ASNR/ CNS/ SAIP/ SCAI/ SIR/ SNIS/ SVM/ SVS guideline on the management of patients with extracranial carotid and vertebral artery disease: executive summary: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines, and the American Stroke Association, American Association of Neuroscience Nurses, American Association of Neurological Surgeons, American College of Radiology, American Society of Neuroradiology, Congress of Neurological Surgeons, Society of Atherosclerosis Imaging and Prevention, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society of Interventional Radiology, Society of Neurointerventional Surgery, Society for Vascular Medicine, and Society for Vascular Surgery. Developed in collaboration with the American Academy of Neurology and Society of Cardiovascular Computed Tomography. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2013; 81:E76-123.
- 6 Imparto AM, Riles TS, Gorstein F. The carotid bifurcation plaque: pathologic findings associated with cerebral ischemia. *Stroke*. 1979; 10:238-45.
- 7 Ministério da Saúde (Brasil), Departamento de Informática do SUS. Brasília. Citado em 15 Ago 2013. Disponível em: <http://www.datasus.gov.br..>
- 8 Carr S, Farb A, Pearce WH, et al. Atherosclerotic plaque rupture in symptomatic carotid stenosis. *J Vasc Surg*. 1996; 23:755-66.

- 9 Chen LJ, Lim SH, Yeh YT, Lien SC, Chiu JJ. Roles of microRNAs in atherosclerosis and restenosis. *J Biomed Sci.* 2012; 19:79.
- 10 Cucio A, Torella D, Indolfi C. Mechanisms of smooth muscle cell proliferation and endothelial injury and stenting. *Circ J.* 2011; 75:1287-1296
- 11 Ricotta JJ, AbuRahma A, Ascher E, et al. Updated Society of Vascular Surgery guidelines for management of extracranial carotid disease. *J Vasc Surg.* 2011; 54:e1-31.
- 12 Little NS, Meyer FB. Carotid endarterectomy – indications, techniques, and mayo clinic experience. 1997; 37:227-235.
- 13 Mantese VA, Timaran CH, Chiu D, Begg RJ, Brott TG. The carotid revascularization endarterectomy versus stenting trial (CREST). *Stroke.* 2010; 41:S31-S34.
- 14 Silver FL, Mackey A, Clark WM, Brooks W, Timaran CH, Chiu D, Goldstein LB, Meschia JF, Ferguson RD, Moore WS, Howard G, Brott TG. Safety of stenting and endarterectomy by symptomatic status in the carotid revascularization endarterectomy versus stenting trial (CREST). *Stroke.* 2011; 42:675-680.
- 15 Adams HP, Zoppo G, Alberts MJ, Bhatt DL, Brass L, Furlan A, Grubb RL, Higashida RT, Jauch EC, Kidwell C, Lyden PD, Morgenstern LB, Qureshi AI, Rosenwasser RH, Scott PA, Wijdicks EFM. Guidelines for the early management of adults with ischemic stroke: a guideline from the American Heart Association/ American Stroke Association Stroke Council, Clinical Cardiology Council, Cardiovascular Radiology and Intervention Council, and the atherosclerotic peripheral vascular disease and quality of care outcomes in research interdisciplinary working groups: the American Academy of Neurology affirms the value of this guideline as an educational tool for neurologists. *Stroke.* 2007; 38:1655-1711.
- 16 Economopoulos KP, Sergentanis TR, Tsivgoulis G, Mariolis AD, Stefanadis C. Carotid artery stenting versus carotid endarterectomy: a comprehensive meta-analysis of short-term and long-term outcomes. *Stroke.* 2011; 42:687-692.
- 17 Dyken ML, Norris JW, Hachinski VC. Stroke risk factors; in Norris JW, Hachinski VC (eds): prevention of stroke. Springer-Verlag, 1991; 83-102.
- 18 Sundt TM, Stundok BA, Whisnant JP. Carotid endarterectomy: complications and preoperative assessment or risk. *Mayo Clin Proced.* 1975; 301-306.

- 19 Sundt TM. Occlusive cerebrovascular disease. Philadelphia: WB Saunders; 1987.
- 20 Moneta GL, Edwards JM, Chitwood RW, et al. Correlation of north-american symptomatic carotid endarterectomy trial (NASCET) angiographic definition of 70-percent to 99-percent internal carotid-artery stenosis with duplex scanning. *J Vasc Surg.* 1993; 17:152-159.
- 21 MRC European Carotid Surgery Trialists. Randomised trial of endarterectomy for recently symptomatic carotid stenosis: final results of the MRC european carotid surgery trial (ECST). *Lancet.* 1998; 351:1379-1387.
- 22 CAVATAS Investigators. Endovascular versus surgical treatment in patients with carotid stenosis in the carotid and vertebral artery transluminal angioplasty study (CAVATAS): a randomised trial. *Lancet.* 2001; 357:1729-1737.
- 23 Hacein-Bey L, Varelas PN. Angioplasty and stenting for cerebrovascular disease: current status. *Neurosurg Clin N Am.* 2008; 19:433-445.
- 24 Alberts MJ, McCann R, Smith TP, et al; The Schneider WallStent Endoprosthesis Clinical Investigators. A randomized trial of carotid stenting vs. endarterectomy in patients with symptomatic carotid stenosis: study design. *J Neurovasc Dis.* 1997; 2:228-234.
- 25 O'Brien B, Carroll W. The evolution of cardiovascular stent materials and surfaces in response to clinical drivers: a review. *Acta Biomater.* 2009; 5:945-958.
- 26 Jim J, Rubin BG, Landis GS, Kenwood CT, Siami FS, Sicard GA. Society for vascular surgery vascular registry evaluation of stent cell design on carotid artery stenting outcomes. *J Vasc Surg.* 2011 Jul; 54:71-9.
- 27 United States Food and Drug Administration (EUA). Medical devices. Citado em 15 Ago 2013. Disponível em: <http://www.fda.gov>.
- 28 Mas JL, Chatellier G, Beyssen B; EVA-3S Investigators. Carotid angioplasty and stenting with and without cerebral protection: clinical alert from the endarterectomy versus angioplasty in patients with symptomatic severe carotid stenosis (EVA-3S) trial. *Stroke.* 2004; 35:e18-e21.
- 29 EVA-3S Investigators. Endarterectomy vs. angioplasty in patients with symptomatic severe carotid stenosis (EVA- 3S) trial. *Cerebrovasc Dis.* 2004; 18: 62-65.

- 30 CaRESS Steering committee. Carotid revascularization using endarterectomy or stenting systems (CaRESS) phase I clinical trial: 1-year results. *J Vasc Surg.* 2005; 42:213-219.
- 31 Yadav JS; The SAPPHERE Investigators. Carotid stenting for the prevention of stroke: three-year follow-up of the SAPPHERE trial and us carotid feasibility demonstrates durability of the procedure. *Apresentado em: Transcatheter Cardiovascular Therapeutics (TCT) Meeting; 2005 Oct 18; Washington, DC.*
- 32 Ringleb PA, Allenberg J, Bruckmann H, et al. 30 day results from the SPACE trial of stent-protected angioplasty versus carotid endarterectomy in symptomatic patients: a randomised non-inferiority trial. *Lancet.* 2006; 368(9543):1239-1247.
- 33 Thurnher S. Carotid stenosis: the technique for PTA and stent implantation. *Radiologe.* 2000; 40:798-804.
- 34 Lanzino G, Rabinstein AA, Brown RD. Treatment of carotid artery stenosis: medical therapy, surgery, or stenting? *Mayo Clin Proc.* 2009; 84:362-368.
- 35 Voute MT, Hendriks JM, van Laanen JH, et al. Radial force measurements in carotid stents: influence of stent design and length of the lesion. *J Vasc Interv Radiol.* 2011; 22:661-6.
- 36 Bosiers M, de Donato G, Deloose K, Verbist J, Peeters P, Castriota F, Cremonesi A, Setacci C. Does free cell area influence the outcome in carotid artery stenting? *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2007; 33:135-41.
- 37 Hart JP, Bosiers M, Deloose K, Uflacker R, Schonholz CJ. Impact of stent design on the outcome of intervention for carotid bifurcation stenosis. *J Cardiovasc Surg.* 2010; 51:799-806.
- 38 Itami H, Tokunaga K, Okuma Y, Hishikawa T, Sugiu K, Ida K, et al. Novel 3D-CT evaluation of carotid stent volume: greater chronological expansion of stents in patients with vulnerable plaques. *Neuroradiology.* 2013; 55:1153-60.
- 39 Tanaka N, Martin JB, Tokunaga K, Abe T, Uchiyama Y, Hayabuchi N, Berkefeld J, Rufenacht DA. Conformity of carotid stents with vascular anatomy: evaluation in carotid models. *Am J Neuroradiol.* 2004; 25:604-7.
- 40 Bosiers M, Deloose K, Verbist J, Peeters P. What practical factors guide the choice of stent and protection device during carotid angioplasty? *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2008 Jun; 35:637-43.

- 41 Pourbaix M. Electrochemical corrosion of metallic biomaterials. *Biomaterials*. 1984; 5:122-34.
- 42 Trepanier C. Corrosion resistance and biocompatibility of passivated nitinol. *Shape Memory Implants*. 2000:35-45.
- 43 Cejna M, Virmani R, Jones R, Bergmeister H, Loewe C, Schoder M, Grgurin M, Lammer J. Biocompatibility and performance of the wallstent and the wallgraft jostent, and hemobahn stent-grafts in a sheep model. *J Vasc Interv Radiol*. 2002; 13:823-30.
- 44 Gotman I. Characteristics of metals used in implants. *J Endourol*. 1997; 11:383-9.
- 45 Pourbaix M. Electrochemical corrosion of metallic biomaterials. *Biomaterials*. 1984; 5:122-34.
- 46 Kim JH, Shin JH, Shin DH, Moon MW, Park K, Kim TH, Shin KM, Won YH, Han DK, Lee KR. Comparison of diamond-like carbon-coated nitinol stents with or without polyethylene glycol grafting and uncoated nitinol stents in a canine iliac artery model. *Br J Radiol*. 2011; 84:210-5.
- 47 Clayton C. Chemical effects of ion implantation: oxidation, corrosion, and catalysis, *ibid.*, pp. 325-356.
- 48 Gröschel K, Riecker A, Schulz JB, Ernemann U, Kastrup A. Systematic review of early recurrent stenosis after carotid angioplasty and stenting. *Stroke*. 2005; 36:367-373.
- 49 Inoue T, Kato T, Hikichi Y, Hashimoto S, Hirase T, Morooka T, Imoto Y, Takeda Y, Sendo F, Node K. Stent-induced neutrophil activation is associated with an oxidative burst in the inflammatory process, leading to neointimal thickening. *Thromb Haemost*. 2006; 95:43-48.
- 50 Setacci C, Chisci E, Setacci F, Iacoponi F, de Donato G. Grading carotid intrastent restenosis: a 6-year follow-up study. *Stroke*. 2008; 39:1189-1196.
- 51 Arquizan C, Trinquart L, Touboul PJ, Long A, Feasson S, Terriat B, Gobin-Metteil MP, Guidolin B, Cohen S, Mas JL. Restenosis is more frequent after carotid stenting than after endarterectomy: the EVA-3S study. *Stroke*. 2011; 42:1015-1020.
- 52 Cho JS, Jeong MH, Sim DS, Hong YJ, Lim KS, Kim JH, Kim HD, Baek JY, Yoon HJ, Her SH, Jin SW, Kim JH, Ahn Y, Cho JG, Park JC, Kang JC. Effects of combined therapy with ezetimibe plus simvastatin after drug-eluting stent

- implantation in a porcine coronary restenosis model. *J Korean Med Sci.* 2010; 25:716-22.
- 53 Gottsauner-Wolf M, Zasmata G, Hornykewycz S, Nikfardjam M, Stepan E, Wexberg P, Zorn G, Glogar D, Probst P, Maurer G, Huber K. Plasma levels of C-reactive protein after coronary stent implantation. *Eur Heart J.* 2000; 21:1152-8.
- 54 Hong YJ, Jeong MH, Choi YH, Ma EH, Ko JS, Lee MG, Park KH, Sim DS, Yoon NS, Youn HJ, Kim KH, Park HW, Kim JH, Ahn Y, Cho JG, Park JC, Kang JC. Usual dose of simvastatin does not inhibit plaque progression and lumen loss at the peri-stent reference segments after bare-metal stent implantation: a serial intravascular ultrasound analysis. *Korean J Intern Med.* 2010; 25:356-63.
- 55 Guzeloglu M, Aykut K, Albayrak G, Atmaca S, Oktar S, Bagriyanik A, Hazan E. Effect of tadalafil on neointimal hyperplasia in a rabbit carotid artery anastomosis model. *Ann Thorac Cardiovasc Surg.* 2013; 31. Epub 2013 Jan 31.
- 56 Ki-Seok K, Song YK, Joon HC, Seung JJ, Dong WK, Myeong CC. Bortezomib reduces neointimal hyperplasia in a rat carotid artery injury model. *Korean Circ J.* 2013; 43:592-9.
- 57 Silva TH, Butera AP, Leal DH, Alves RJ. Agentes antitumorais inibidores da angiogênese – modelos farmacofóricos para inibidores da integrina  $\alpha v\beta 3$ . *Rev Bras Cie Far.* 2007; 43:1-17.
- 58 Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT. Foreign body reaction to biomaterials. *Semin Immunol.* 2008; 20:86-100.
- 59 Anderson JM. Biological responses to materials. *Annu Rev Mater Res.* 2001; 31:81-110.
- 60 Wilson CJ, Clegg RE, Leavesley DI, Percy MJ. Mediation of biomaterial-cell interactions by adsorbed proteins: a review. *Tissue Eng.* 2005; 11:1-18.
- 61 Gretzer C, Emanuelsson L, Liljensten E, Thomsen P. The inflammatory cell influx and cytokines changes during transition from acute inflammation to fibrous repair around implanted materials. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2006; 17(6):669-87.

- 62 Horbett T. The role of adsorbed proteins in tissue response to biomaterials. In: Ratner B, et al., editores. Biomaterials science: an Introduction to biomaterials in medicine. San Diego: Elsevier Academic Press; 2004. pp. 237-46.
- 63 Luttkhuizen DT, Harmsen MC, Van Luyn MJ. Cellular and molecular dynamics in the foreign body reaction. *Tissue Eng.* 2006; 12:1955-70.
- 64 Giancotti FG, Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science.* 1999; 285:1028-32.
- 65 Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P, Halbwachs-Mecarelli L. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest.* 2000; 80:617-53.
- 66 Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis – an update. *Engl J Med.* 1986; 314:488-500.
- 67 Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med.* 2005; 352:1685-1695.
- 68 Zhou J, Tsai YT, Weng H, Tang EN, Nair A, Davé DP, Tang L. Real-time detection of implant-associated neutrophil responses using a formyl peptide receptor-targeting NIR nanoprobe. *Int J Nanomedicine.* 2012; 7:2057-68.
- 69 Maher BM, Dhonnchu TN, Burke JP, Soo A, Wood AE, Watson RW. Statins alter neutrophil migration by modulating cellular rho activity-a potential mechanism for statins-mediated pleiotropic effects? *J Leukoc Biol.* 2009 85:186-93.
- 70 Futosi K, Fodor S, Mócsai A. Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. *Int Immunopharmacol.* 2013; 17:638-50.
- 71 Adams DH, and Shaw S. Leucocyte-endothelial interaction and regulation of leukocyte migration. *Lancet.* 1994; 343:831-836.
- 72 Berton G, Lowell CA. Integrin signalling in neutrophils and macrophages. *Cell Signal.* 1999; 11:621-35.
- 73 Lee YM, Hybertson BM. Platelet-activating factor induces lung inflammation and leak in rats: hydrogen peroxide production along neutrophil-lung endothelial cell interfaces. *J Lab Clin Med.* 2002; 140:312-9.
- 74 Santos, K. C. Análise proteômica comparativa entre neutrófilos não ativados e neutrófilos ativados com PMA, um análogo do diacilglicerol. Brasília (DF): Universidade de Brasília. 2007.



- 75 Haslett C, Guthrie LA. Modulation of multiple neutrophil functions by preparative methods or trace concentrations of bacterial lipopolysaccharide. *Am J Pathol.* 1985; 119:101-10.
- 76 Botha AJ, Moore FA. Postinjury neutrophil priming and activation states: therapeutic challenges. *Shock.* 1995; 3:157-66.
- 77 Alves CQ, David JM, David JP, Bahia MV, Aguiar RM. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substrato orgânicos. *Quim Nova.* 2010; 33:2202-10.
- 78 Butler LRP, Laqua K. Instrumentation for the spectral dispersion and isolation of optical radiation. *Pure & Appl. Chem.* 1995; 1725-44.
- 79 Leduc EH, Holt SJ. Hydroxypropyl methacrylate, a new water-miscible embedding medium for electron microscopy. *J Cell Biol.* 1965; 26:137-55.
- 80 Giuvărășteanu I. Scanning electron microscopy of vascular corrosion casts – standard method for studying microvessels. *Rom J Morphol Embryol.* 2007; 48:257-61.
- 81 Carroll W, Kellyand MB. Corrosion behavior of nitinol wires in body fluid environment. *Technologies Antwerpen.* 1999, pp. 240-249.
- 82 Oshida Y, Miyazaki S. Corrosion and biocompatibility of shape memory alloys, *Corr. Eng.* 1991; 40:1009-1025.
- 83 Yang J, Shanbhag A, Lilien J, Black J. Human neutrophil response to short-term exposure to F-75 cobalt-based alloy. *J Biomed Mater Res.* 1992; 26:1217-1230.
- 84 Keegan GM, Learmonth ID, Case CP. A systematic comparison of the actual, potential, and theoretical health effects of cobalt and chromium exposures from industry and surgical implants. *Crit Rev Toxicol.* 2008; 645-74.
- 85 Wiltshire W, Ferreira M. Lightelm J. Allergies to dental metals. *Quintessence Int.* 1996; 27:513-520.
- 86 Lacy S, Meritt K, Brown S, Puryear A. Distribution of nickel and cobalt following dermal and systematic administration with in vitro and in vivo studies. *J Biomed Mater Res.* 1996; 32; 279-283.
- 87 Goyer R. Toxic effect of metals. In: Klassen C, Amdun M, Doull J. Cassarett and doull's toxicology. New York: Macmillan; 1986. p. 582-635.
- 88 Hayes R. The carcinogenicity of metals in human. *Cancer Causes and Control.* 1997; 8:321-327.

- 89 Oller A, Costa M. Carcinogenicity assessment of selected nickel compounds. *Toxicol Appl Pharmac.* 1997; 143:152-166.
- 90 Ryhänen J. Biocompatibility evaluation of nickel-titanium shape memory metal alloy [dissertação]. Oulu: Universidade de Oulu; 1999.
- 91 Xin XZ, Chen J, Xiang N, Wei B. Surface properties and corrosion behavior of co-cr alloy fabricated with selective laser melting technique. *Cell Biochem Biophys.* 2013; 4:62-70.
- 92 Shabalovskaya SA. Surface, corrosion and biocompatibility aspects of nitinol as an implant material. 2002; 12:69-109.
- 93 Barrelet RD; Bishara SE, Quinn IK. Biodegradation of orthodontic appliances: bio-degradation of nickel and chromium in vitro. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1993; 103 (parte 1):8-14.
- 94 Bilhara SE, Barrett RD, Selim MI. Biodegradation of orthodontic appliances: changes in the blood level of nickel. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1993; 103(parte 2):115-119.
- 95 Al-Waheidi EM. Allergic reaction to nickel orthodontic wires: a case report. *Quintessence Int.* 1995; 26:385-7.
- 96 Al-Waheidi EM, Harradine NW. Soft tissue profile changes in patients with cleft lip and palate following maxillary osteotomies. *Cleft Palate Craniofac J.* 1998; 35:535-43.
- 97 Ong JL, Lucas LC. Auger electron spectroscopy and its use for the characterization of titanium and hydroxyapatite surfaces. *Biomaterials.* 1998; 19:455-64.
- 98 Shabalovskaya S, Anderagg J, Sachdeva R, Harmon B, Preliminary XPS spectroscopic characterization of autoclaved TiNi shape memory alloys for implants. In: *Biomaterials for Drug and Cell Delivery*, Pittsburgh (PA): MRS; 1994; 331:239-244.
- 99 De Nardo L, Raffaini G, Ebramzadeh E, Ganazzoli F. Titanium oxide modeling and design for innovative biomedical surfaces: a concise review. *Int J Artif Organs.* 2012; 35:629-41.

## ANEXO A – ARTIGO ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO

### ACTIVATION OF NEUTROPHILS EXPOSED TO CAROTID STENTS IN VITRO ACTIVATION OF NEUTROPHILS EXPOSED TO NITINOL AND COBALT- CHROME CAROTID ARTERY STENTS IN VITRO

#### Abstract

**Introduction:** Carotid artery stenting (CAS) is an alternative treatment for atherosclerotic occlusive disease. In the medium term, the main complication of CAS is the in-stent restenosis (4.8% in two years), for which the main triggering factor is the foreign body inflammatory response to the carotid stent (CS).

**Objectives:** There are different types of CS available, and they basically consist of two different alloys: cobalt-chrome (Wallstent®) and Nitinol (Protégé®). This study compared the structural characteristics and the inflammatory activation of neutrophils when exposed to both types of CS, checking the production of free radicals with the use of optical spectroscopy.

**Materials and methods:** 20 ml of blood collected from 19 healthy volunteer patients were centrifuged using the Percoll method for neutrophil separation. Neutrophils were exposed to the stent surface for 40-minute periods in a nitroblue tetrazolium (NBT) solution. After the incubation period, the results were transmittance-measured using an optical spectrophotometer at a 550 nm wavelength. After that, a portion of each sample was sent for scanning optical microscopy and morphophysiological analysis of the CS and the adherent neutrophils.

**Results:** The spectrophotometer reading showed that the Nitinol (NT) alloy was responsible for a statistically significant increased production of reactive species of oxygen when compared to the cobalt-chrome (CbCr) alloy (0.114 +/- 0.062 vs. 0.085 +/- 0.050 transmittance level,  $p = 0.02$  and CI 95% 0.0052 to 0.0534). Scanning electron microscope images showed that the NT CS mesh has rectangular cross sections, and the CbCr CS mesh has cylindrical cross sections.

**Conclusion:** Both alloys triggered free radical formation by neutrophil activation. The NT alloy showed significantly higher reactivity than the CbCr alloy. This result may be caused by a greater and earlier release of nickel ions by the NT alloy.

**Key words:** Carotid Angioplasty, Carotid Stenting, Inflammatory Activity, Free Radicals, Neutrophils, Electron Microscopy.

## 1. Introduction

Percutaneous angioplasty with carotid artery stenting (CAS) has been a viable alternative for treatment of the carotid artery atheroma, showing satisfactory results and low morbid-mortality rates.<sup>1-10</sup>

The carotid artery stent is an expandable metallic tube which partially or totally reperfuses the arterial lumen. There are several types of carotid stents, varying in size, conformity, metallic alloy (MA), and braiding pattern (open- or closed-mesh). In general, the most common carotid artery stent consists of two metallic alloys: cobalt-chrome (CbCr) and nickel/titanium, known as Nitinol (NT).<sup>1-4</sup> The more bioequivalent the alloy is, the less acute the inflammatory response when implanted. It is also directly proportional to corrosion when exposed to the blood plasma.<sup>11-13</sup>

Therefore, CbCr and NT might trigger different degrees of inflammatory activation.<sup>14-18</sup> In short and long terms, it may cause significant post-stenting complications, such as restenosis or intrastent thrombosis.<sup>19-23</sup> The average incidence rate of neointimal proliferation with intrastent restenosis is 4.8% in two years, and is mostly caused by an inflammatory response due to intimal lesions during or after stent implantation.<sup>24-27</sup>

An increase in inflammatory markers, such as C-reactive protein and interleukin 6, in the first 72 hours after the carotid stent implantation may double the risk of intraluminal restenosis.<sup>28-30</sup>

The foreign body reaction triggered by the carotid stent is first caused by complement proteins that adhere to the stent surface. This complement eventually activates inflammatory cells, especially the neutrophils. However, recent studies have shown

that the metallic alloy itself may cause structural changes in the neutrophils, even without the complement proteins.<sup>31,32</sup>

This study aims to assess the morphophysiological characteristics of neutrophil activation triggered by exposure to CbCr and NT carotid stents through optical spectroscopy techniques. This study also aims to identify possible CbCr and NT factors that might affect foreign body-type inflammation caused by the implantation of non-autologous prostheses.

## **2. Objectives**

To assess the inflammatory response *in vitro* of neutrophils exposed to CbCr and NT carotid stents through optical spectroscopy techniques.

To identify the morphophysiological inflammatory characteristics of the activated neutrophils, taking into account the properties inherent to each metallic alloy.

## **3. Materials and methods**

### **3.1. Study population**

Twenty healthy volunteers ranging between 20 to 40 years of age were selected for this clinical test. All met the following criteria: healthy subjects, male, absence of any active inflammatory or infectious diseases in the 30 days prior to inclusion, no use of any anti-inflammatory (hormonal or not) drugs in the 30 days prior to inclusion, and no sleep deprivation in the week prior to inclusion.

Volunteers who did not meet the inclusion criteria were excluded, as well as volunteers with an increase in plasma reference values of C-reactive protein and leukocytosis.

A 23 ml sample of full blood was collected from each subject. 20 ml were reserved for neutrophil separation using Percoll gradients (consisting of particles of non-toxic, inert silica, non-adherent to membranes, recommended for the purification of cell and

organelles).<sup>33</sup> The remaining 3 ml were used for leukogram and dosage of C-reactive protein. The 20 ml samples were sent to the UnB Laboratory of Biochemistry and Protein Chemistry (LBQP), and the 3 ml samples were sent to the UnB Laboratory of Clinical Analysis.

### **3.2. Carotid stent procedure & preparation**

Two types of self-expandable carotid stents were used for this experiment: one was made from a cobalt-chrome metallic alloy, *Wall Stent*® (Stryker, Kalamazoo, MI); and the other was made of Nitinol, *Protegé*® (Covidien, Irvine, CA). They were transversally sectioned in 10 mm fragments in order to avoid loss of braided mesh. They were then placed in Eppendorf tubes.

### **3.3. Study design and sample processing**

The samples were labeled in four groups and incubated at 37°C for 40 minutes in technical triplicates (Figure 1):

- a) Negative control: Eppendorf tube with  $5 \times 10^5$  incubated neutrophils with NBT (1 mg/ml; Nitroblue Tetrazolium);
- b) Positive control: Eppendorf tube with  $5 \times 10^5$  neutrophils, NBT (1 mg/ml) and PMA (100 ng/ml; phorbol 12-myristate 13-acetate, a strong *in vitro* neutrophil trigger)<sup>34</sup>
- c) Metallic alloy 1: Eppendorf tube with  $5 \times 10^5$  neutrophils, NBT (1 mg/ml) and NT stent;
- d) Metallic alloy 2: Eppendorf tube with  $5 \times 10^5$  neutrophils, NBT (1 mg/ml) and CbCr stent.

### **3.4. Neutrophils: physiological analysis**

After the incubation period, the results were transmittance measured using a UV-1800® optical spectrophotometer (Shimadzu, Kyoto, JP) at a 550 nm wavelength, in accordance with the procedure standards of this technique.<sup>35,36</sup>

After exposure to the reactive-oxygen species, the NBT is reduced and changes to blue, in proportion to the amount of formed free radicals.<sup>35,36</sup>

### **3.5. Stents: morphological analysis**

After being measured in the spectrophotometer, one sample of each carotid stent was analyzed using a scanning electron microscope (JEOL JSM 7001F model). The images were registered in pictures. Mesh conformity of each carotid stent was analyzed, as well as the characteristics of the adherent neutrophils.

### **3.6. Statistical analysis and ethical considerations**

Arithmetic means of the technical triplicates were calculated for each stent: negative control (no neutrophil activators), positive control (PMA solution), and compared to one another. The statistical analysis was done using Statplus Professional 2009 (<http://www.analystsoft.com/en/products/statplus/>). Student's t-test was applied and considered statistically significant when  $p < 0.05$ .

This study was conducted in accordance with Resolution 06/96 upon research on human beings, and was submitted for approval by the UnB Research Ethics Committee (CEP).

## **4. Results**

One out of the 20 volunteers who met the inclusion criteria was excluded due to the presence of PCR levels above the normal limits, suggesting active infection or inflammation. As a result, the final study population was reduced to 19.

Both carotid stent types significantly activated the neutrophils exposed to solution when compared to the negative control  $p = 0.0146$  (CI 95% from 0.0061 to 0.0492) for the CbCr stent; and  $p < 0.0001$  (CI 95% 0.0305 to 0.834) for the NT stent. However, the same result was not repeated in the positive control solutions:  $p = 0.0021$  for CbCr vs. PMA: (CI 95% -0.1072 to 0.028), and  $p = 0.0774$  NT vs. PMA (CI 95% -0.0813 to 0.0047) (Tables 1 and 2).

A comparative analysis between the carotid stent types showed a significantly larger reactivity level of the NT alloy in relation to the CbCr alloy ( $p = 0.02$  and CI 95% from 0.0052 to 0.0534) (Table 2 and Figure 2).

Optical microscope results showed that the NT stent mesh has a rectangular cross section and the CbCr stent has a cylindrical cross section. There were not enough images available for a statistical analysis of specific morphologic changes in the neutrophils (Figure 3).

## 5. Discussion

CAS has become an increasingly common procedure for carotid stenosis treatment.<sup>1-4</sup> However, despite the evolution of interventional techniques and additions to the drug arsenal, restenosis and/or stent thrombosis formation are complications that need attention.

Restenosis may occur either early (up to six months after angioplasty) or late (six months after the procedure).<sup>28-30</sup> The early form is usually due to a platelet thrombus formation on the wall of the stent metal mesh, caused by the activation of the coagulation cascade and inflammatory cells. Thus, early restenosis is basically dependent upon the thromboresistance capacity of the alloy.<sup>28-30</sup> The use of platelet antiaggregants and anticoagulation after CS insertion aims to minimize such events.<sup>28-30</sup> However, this feature was not analyzed in this study.

On the other hand, late restenosis is usually caused by peri-stent neointimal proliferation, triggered by the release of growth factors (such as the platelet and endothelial growth factor), secondary to foreign body inflammatory response.<sup>22-24</sup> Thus, late restenosis is primarily dependent on the biocompatibility (the capacity to generate the smallest possible foreign body response) of the MA used.<sup>11-14,22-24,28-30</sup> Gottsauner-Wolf found out that the increase of inflammatory markers, such as C-reactive protein, in the first 48 hours after insertion of the coronary stent may double the incidence of restenosis.<sup>37</sup>

Although CbCr and NT alloys are highly biocompatible, the present study identified specific differences of each material. Metal mesh biocompatibility depends on



corrosion resistance and on the release of metal ions and other particles in the surrounding environment.<sup>14-18</sup> Corrosion resistance is caused by the stability of the oxide layer formed on the alloy surface.<sup>14-18</sup> For the CbCr alloy, CrO<sub>3</sub> is formed; for the Nitinol alloy, TiO<sub>2</sub> is formed.<sup>14-18</sup> The larger the distance is between the resting potential (RP) and the barrier breakdown potential (BP) of the MA, the higher the stability.

The CbCr alloy value for RP is 0.5 V; for BP, it is 0.85 V. For the NT alloy, the value for RP is 0.23 V; for BP, 24V.<sup>14</sup> Considering properties such as corrosion resistance, NT is described as more resistant and more “inert.” However, in this study, the opposite was observed, as the NT alloy was more reactive in relation to the CbCr ( $p = 0.02$ ), as shown in Picture 2.

Galvanic corrosion resulted when CS was exposed to plasma. In this scenario, the rupture of the protective oxide layer resulted in negatively charged metal ions. The proteins of the complement receive the ion’s negative charge when they are in contact, changing into active conformation. Then, they eventually activate any circulating neutrophil, triggering an inflammatory cascade.<sup>19,33-35</sup> However, in this experiment, the proteins were excluded from the solution under analysis, thus corrosion resistance is a weak argument to explain this result. On the other hand, the alloys gradually release nonionic and ionic toxic residues, even in the absence of any visual or chemical sign of corrosion.<sup>15,25,26</sup>

The CbCr alloy used in this study consists of 35% nickel, whereas the Nitinol alloy consists of 50% nickel.<sup>15,25,26</sup> Studies *in vitro* have shown that there is nickel released in buffer solutions by both CbCr and NT alloys, with the release in the latter earlier and more intense, taking place in the first few hours.<sup>38,39</sup> Moreover, nickel is known to be one of the most immunoreactive elements, either in direct contact or when diluted in blood plasma, causing several idiosyncratic reactions.<sup>14,15,18,25,26,40</sup> Some reports show that the nickel metal ion at low concentrations leads to mild stimulation of human lymphocytes; when highly concentrated, it decreases cell replication that may trigger apoptosis.<sup>14,15,18</sup> After its release into the bloodstream, nickel can be deposited in the lungs. Some cases report interstitial pulmonary fibrosis and liver fibrosis, which may lead to cirrhosis and eventual carcinomas, as well as renal fibrosis, causing kidney failure and glomerulonephritis.<sup>14,15,18</sup>

The other important component of the NT alloy is titanium, considered the most “inert” metal. Among the four major elements used in the studied alloys (Ni, Ti, Cr, and Co), Ti is the only one that is not naturally found in different amounts in the body. However, little is known about Ti toxicity.<sup>17</sup> Studies have been made about osteolytic reactions to pure Ti prostheses.<sup>17</sup> Experiments *in vitro* have also shown inhibition of osteoblasts and lymphocyte proliferation in rats, as well as increased proliferation of fibroblasts.<sup>17</sup>

Regarding the CbCr alloy, its ionic form Cr(IV) is known to be oncogenic. There are several studies on the relationship between chromium industry workers and the incidence of lung and kidney cancer and myeloproliferative diseases.<sup>25,26</sup> Evidence is still lacking on the genotoxicity of Cr(III) and chromium metal. Another key point is that the release of Cr(IV) by alloys in biological implants is still controversial.<sup>25,26</sup> For cobalt, studies show a similar capacity for idiosyncratic reactions, especially when associated with carbides, particularly in regards to industrial exposure of cobalt.<sup>25,26</sup> There are a few reports in the literature that attribute adverse reactions solely to cobalt.<sup>25,26</sup> Al-Waheidi reported cobalt-related bone necrosis in prostheses in nine out of 14 cases.<sup>41</sup>

The main reports of inflammatory activation of the CbCr alloys refer to metal-on-metal orthopedic prostheses. Friction between their metallic components is constant in this type of prosthesis, leading to small tears in the alloy surface and to the release of CbCr in different sizes.<sup>26,27</sup> Studies have shown that the smaller the particles, the greater the macrophage activation potential, the formation of free radicals, and the triggering of a persistent and detrimental inflammatory response.<sup>26,27</sup> However, such micro-lacerations are not found in vascular prostheses.

Comparing the surfaces of the two meshes analyzed on the scanning electron microscopy images captured during this study, it was observed that the NT stent mesh has a rectangular cross section, and the CbCr stent mesh has a cylindrical cross section (Picture 3). There are a few comparative studies regarding the activation of neutrophils and the contact surface. However, there is a tendency for greater activation on uneven or asymmetrical surfaces.<sup>31,42</sup> Such characteristics

might favor an increase in neutrophil activation caused by the NT stent. However, there were not enough images available for an appropriate statistical analysis. Spectroscopy surface studies (X-ray photoelectron spectroscopy and Auger electron spectroscopy) have also shown that more irregular and asymmetrical surfaces resulted in a thinner TiO<sub>2</sub> layer, causing a greater loss of nickel ion.<sup>15,43,44</sup>

Thus, it is believed that the irritant effects of nickel ion to neutrophils have been one of the major factors for the difference between NT and CbCr stents regarding inflammatory reactivity.

## 6. Conclusion

Morphophysiological activation of neutrophils when exposed to CbCr and NT CS *in vitro* showed peculiarities for each MA, with NT significantly more reactive. This result seems to be related to the greater initial nickel ion release by the Nitinol alloy. However, further studies using CAS models *in vivo* are needed for better analysis.

Both alloys have shown to be likely to activate the formation of free radicals by neutrophils in 40-minute buffer exposure times compared to the negative control sample. Although more resistant to corrosion, the Nitinol alloy presented higher statistical reactivity than the cobalt-chrome alloy. Further studies are needed to assess the actual significance of this initial difference with respect to carotid in-stent late restenosis.

The analysis of the mechanisms involved in this type of inflammatory reaction may significantly contribute to the understanding of late inflammatory foreign body reactions, leading to measures that may interfere with the processes of post-CAS carotid restenosis.

## References

1. Mantese VA, Timaran CH, Chiu D, Begg RJ, Brott TG. The Carotid Revascularization Endarterectomy Versus Stenting Trial (CREST). *Stroke*. 2010;41:S31-S34.
2. Silver FL, Mackey A, Clark WM, Brooks W, Timaran CH, Chiu D, Goldstein LB, Meschia JF, Ferguson RD, Moore WS, Howard G, Brott TG. Safety of stenting and endarterectomy by symptomatic status in the Carotid Revascularization Endarterectomy Versus Stenting Trial (CREST). *Stroke*. 2011;42:675-680.
3. Adams HP, Zoppo G, Alberts MJ, Bhatt DL, Brass L, Furlan A, Grubb RL, Higashida RT, Jauch EC, Kidwell C, Lyden PD, Morgenstern LB, Qureshi AI, Rosenwasser RH, Scott PA, Wijdicks EFM. Guidelines for the Early Management of Adults With Ischemic Stroke: A Guideline From the American Heart Association/ American Stroke Association Stroke Council, Clinical Cardiology Council, Cardiovascular Radiology and Intervention Council, and the Atherosclerotic Peripheral Vascular Disease and Quality of Care Outcomes in Research Interdisciplinary Working Groups: The American Academy of Neurology affirms the value of this guideline as an educational tool for neurologists. *Stroke*. 2007;38:1655-1711.
4. Economopoulos KP, Sergentanis TR, Tsigoulis G, Mariolis AD, Stefanadis C. Carotid Artery Stenting Versus Carotid Endarterectomy A Comprehensive Meta-Analysis of Short-Term and Long-Term Outcomes. *Stroke*. 2011;42:687-692.
5. Dyken ML, Norris JW, Hachinski VC. Stroke risk factors. *Prevention of Stroke*. Springer-Verlag, 1991:83-102.
6. Sundt TM, Stundok BA, Whisnant JP. Carotid Endarterectomy: Complications and preoperative assessment or risk. *Mayo Clin Proc*. 1975: 301-306.
7. Sundt TM. Occlusive cerebrovascular disease. W. B. Saunders. Philadelphia. 1987.
8. Moneta GL, Edwards JM, Chitwood RW, et al. Correlation of North-American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial (NASCET) angiographic definition of 70-percent to 99-percent internal carotid-artery stenosis with duplex scanning. *J Vasc Surg* 1993;17:152-159.
9. MRC European Carotid Surgery Trialists. Randomised trial of endarterectomy for recently symptomatic carotid stenosis: final results of the MRC European Carotid Surgery Trial (ECST). *Lancet* 1998;351:1379-1387.
10. CAVATAS Investigators. Endovascular versus surgical treatment in patients with carotid stenosis in the Carotid and Vertebral Artery Transluminal Angioplasty Study (CAVATAS): a randomised trial. *Lancet*. 2001;357:1729-1737.
11. O'Brien B, Carroll W. The evolution of cardiovascular stent materials and surfaces in response to clinical drivers: a review. *Acta Biomater*. 2009;5:945-958.
12. Hacin-Bey L, Varelas PN. Angioplasty and stenting for cerebrovascular disease: current status. *Neurosurg Clin N Am*. 2008;19:433-445.

13. Tanaka N, Martin JB, Tokunaga K, Abe T, Uchiyama Y, Hayabuchi N, Berkefeld J, Rufenacht DA. Conformity of carotid stents with vascular anatomy: evaluation in carotid models. *AJNR Am J Neuroradiol.*2004;25:604-7.
14. Pourbaix M. Electrochemical corrosion of metallic biomaterials. *Biomaterials.* 1984;5:122-34.
15. Trepanier C. Corrosion resistance and biocompatibility of passivated nitinol. *Shape Memory Implants;* 2000:35-45.
16. Cejna M, Virmani R, Jones R, Bergmeister H, Loewe C, Schoder M, Grgurin M, Lammer J. Biocompatibility and performance of the Wallstent and the Wallgraft Jostent, and Hemobahn stent-grafts in a sheep model. *J Vasc Interv Radiol.* 2002;13:823-30.
17. Gotman I. Characteristics of Metals Used in Implants. *J Endourol.* 1997; 11: 383-9.
18. Pourbaix M. Electrochemical corrosion of metallic biomaterials. *Biomaterials.* 1984;5:122-34.
19. Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P, Halbwachs-Mecarelli L. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest.* 2000;80:617-53.
20. Zhou J, Tsai YT, Weng H, Tang EN, Nair A, Davé DP, Tang L. Real-time detection of implant-associated neutrophil responses using a formyl peptide receptor-targeting NIR nanoprobe. *Int J Nanomedicine.* 2012;7:2057-68.
21. Ross R. The Pathogenesis of Atherosclerosis — An Update. *Engl J Med.*1986; 314:488-500.
22. Hansson GK. Inflammation, Atherosclerosis, and Coronary Artery Disease. *N Engl J Med.*2005; 352:1685-1695.
23. Maher BM, Dhonnchu TN, Burke JP, Soo A, Wood AE, Watson RW. Statins alter neutrophil migration by modulating cellular Rho activity—a potential mechanism for statins-mediated pleiotropic effects? *J Leukoc Biol.* 2009;85:186-93.
24. Inoue T, Kato T, Hikichi Y, Hashimoto S, Hirase T, Morooka T, Imoto Y, Takeda Y, Sendo F, Node K. Stent-induced neutrophil activation is associated with an oxidative burst in the inflammatory process, leading to neointimal thickening. *Thromb Haemost.*2006;95:43-48.
25. Yang J, Shanbhag A, Lilien J, Black J. Human neutrophil response to short-term exposure to F-75 cobalt-based alloy. *J Biomed Mater Res.*1992;26:1217-1230.
26. Keegan GM, Learmonth ID, Case CP. A systematic comparison of the actual, potential, and theoretical health effects of cobalt and chromium exposures from industry and surgical implants. *Crit Rev Toxicol.*2008;645-74.
27. Xin XZ, Chen J, Xiang N, Wei B. Surface Properties and Corrosion Behavior of Co-Cr Alloy Fabricated with Selective Laser Melting Technique. *Cell Biochem Biophys.*2013;4:62-70.

28. Gröschel K, Riecker A, Schulz JB, Ernemann U, Kastrup A. Systematic review of early recurrent stenosis after carotid angioplasty and stenting. *Stroke*.2005;36:367-373
29. Setacci C, Chisci E, Setacci F, Iacoponi F, de Donato G. Grading Carotid Intrastent Restenosis A 6-Year Follow-Up Study. *Stroke*.2008;39:1189-1196.
30. Arquizan C, Trinquart L, Touboul PJ, Long A, Feasson S, Terriat B, GobinMetteil MP, Guidolin B, Cohen S, Mas JL. Restenosis Is More Frequent After Carotid Stenting Than After Endarterectomy The EVA-3S Study. *Stroke*.2011;42:1015-1020.
31. Cho JS, Jeong MH, Sim DS, Hong YJ, Lim KS, Kim JH, Kim HD, Baek JY, Yoon HJ, Her SH, Jin SW, Kim JH, Ahn Y, Cho JG, Park JC, Kang JC. Effects of combined therapy with ezetimibe plus simvastatin after drug-eluting stent implantation in a porcine coronary restenosis model. *J Korean Med Sci*. 2010;25:716-22.
32. Hong YJ, Jeong MH, Choi YH, Ma EH, Ko JS, Lee MG, Park KH, Sim DS, Yoon NS, Youn HJ, Kim KH, Park HW, Kim JH, Ahn Y, Cho JG, Park JC, Kang JC. Usual dose of simvastatin does not inhibit plaque progression and lumen loss at the peri-stent reference segments after bare-metal stent implantation: a serial intravascular ultrasound analysis. *Korean J Intern Med*. 2010;25:356-63.
33. Haslett C, Guthrie LA. Modulation of multiple neutrophil functions by preparative methods or trace concentrations of bacterial lipopolysaccharide. *Am J Pathol*. 1985;119:101-10.
34. Botha AJ, Moore FA. Postinjury neutrophil priming and activation states: therapeutic challenges. *Shock*. 1995;3:157-66.
35. Lee YM, Hybertson BM. Platelet-activating factor induces lung inflammation and leak in rats: hydrogen peroxide production along neutrophil-lung endothelial cell interfaces. *J Lab Clin Med*. 2002;140:312-9.
36. Butler LRP, Laqua K. Instrumentation for the spectral dispersion and isolation of optical radiation. *Pure & Appl. Chem*.1995;1725-44.
37. Gottsauner-Wolf M, Zasmata G, Hornykewycz S, Nikfardjam M, Stepan E, Wexberg P, Zorn G, Glogar D, Probst P, Maurer G, Huber K. Plasma levels of C-reactive protein after coronary stent implantation. *Eur Heart J*. 2000;21:1152-8.
38. Barrelet RD, Bishara SE, Quinn IK. Biodegradation of orthodontic appliances. Part I. Bio-degradation of nickel and chromium in vitro. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 1993;103:8-14.
39. Bilhara SE, Barrett RD, Selim MI. Biodegradation of orthodontic appliances. Part II. Changes in the blood level of nickel. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 1993;103:115-119.
40. Al-Waheidi EM. Allergic reaction to nickel orthodontic wires: a case report. *Quintessence Int*. 1995;26:385-7.
41. Al-Waheidi EM, Harradine NW. Soft tissue profile changes in patients with cleft lip and palate following maxillary osteotomies. *Cleft Palate Craniofac J*. 1998;35:535-43.

42. Kim JH, Shin JH, Shin DH, Moon MW, Park K, Kim TH, Shin KM, Won YH, Han DK, Lee KR. Comparison of diamond-like carbon-coated nitinol stents with or without polyethylene glycol grafting and uncoated nitinol stents in a canine iliacartery model. *Br J Radiol.* 2011;84:210-5.
43. Ong JL, Lucas LC. Auger electron spectroscopy and its use for the characterization of titanium and hydroxyapatite surfaces. *Biomaterials.* 1998;19:455-64.
44. De Nardo L, Raffaini G, Ebramzadeh E, Ganazzoli F. Titanium oxide modeling and design for innovative biomedical surfaces: a concise review. *Int J Artif Organs.* 2012;35:629-41.

Table 1: Absolute values in spectrophotometry, leukocyte count, and C-reactive protein dosage						
Sample	Cobalt-chrome	Nitinol	Negative control	Positive control (PMA)	Leukocyte count (mm <sup>3</sup> )	C-reactive protein (mg/dL)
1	0.070	0.054	0.046	0.148	0.070	0.054
2	0.107	0.121	0.064	0.187	0.107	0.121
3	0.037	0.042	0.018	0.165	0.037	0.042
4	0.079	0.140	0.034	0.213	0.079	0.140
5	0.108	0.116	0.064	0.183	0.108	0.116
6	0.041	0.033	0.019	0.157	0.041	0.033
7	0.044	0.082	0.033	0.215	0.044	0.082
8	0.137	0.161	0.076	0.284	0.137	0.161
9	0.021	0.029	0.020	0.113	0.021	0.029
10	0.181	0.200	0.155	0.224	0.181	0.200
11	0.022	0.029	0.021	0.110	0.022	0.029
12	0.078	0.156	0.073	0.186	0.078	0.156
13	0.182	0.197	0.155	0.209	0.182	0.197
14	0.080	0.156	0.075	0.185	0.080	0.156
15	0.157	0.180	0.079	0.128	0.157	0.180
16	0.045	0.117	0.027	0.143	0.045	0.117
17	0.048	0.117	0.028	0.143	0.048	0.117
18	0.056	0.191	0.047	0.072	0.056	0.191
19	0.048	0.073	0.057	0.188	0.048	0.073
Average and standard deviation	0.081 +/- 0.050	0.115 +/- 0.058	0.057 +/- 0.039	0.171 +/- 0.048	9.073 +/- 1.137	0.22 +/- 0.05

**Table 1: Results obtained by transmittance spectroscopy with a 550 nm wavelength; lab values for leukocyte count and C-reactive protein obtained for each sample.**

	Cobalt-chrome	Nitinol	Negative control	Positive control
Cobalt-chrome	-	p = 0.002 (IC95% 0.00052 a 0.0534)	p < 0.0001 (IC95% 0.0152 a 0.0320)	p = 0.0088 (IC95% 0.0072 a 0.1077)
Nitinol	p = 0.002 (IC95% 0.00052 a 0.0534)	-	p < 0.0001 (IC95% 0.0324 a 0.0835)	p = 0.0006 (IC95% 0.0865 a 0.0248)
Negative control	p < 0.0001 (IC95% 0.0152 a 0.0320)	p < 0.0001 (IC95% 0.0324 a 0.0835)	-	p < 0.0001 (IC95% 0.098 a 0.1292)
Positive control	p = 0.0088 (IC95% 0.0072 a 0.1077)	p = 0.0006 (IC95% 0.0865 a 0.0248)	p < 0.0001 (IC95% 0.098 a 0,1292)	-

Table 2: Statistical analysis showing p-values of the compared samples, with their respective confidence intervals.

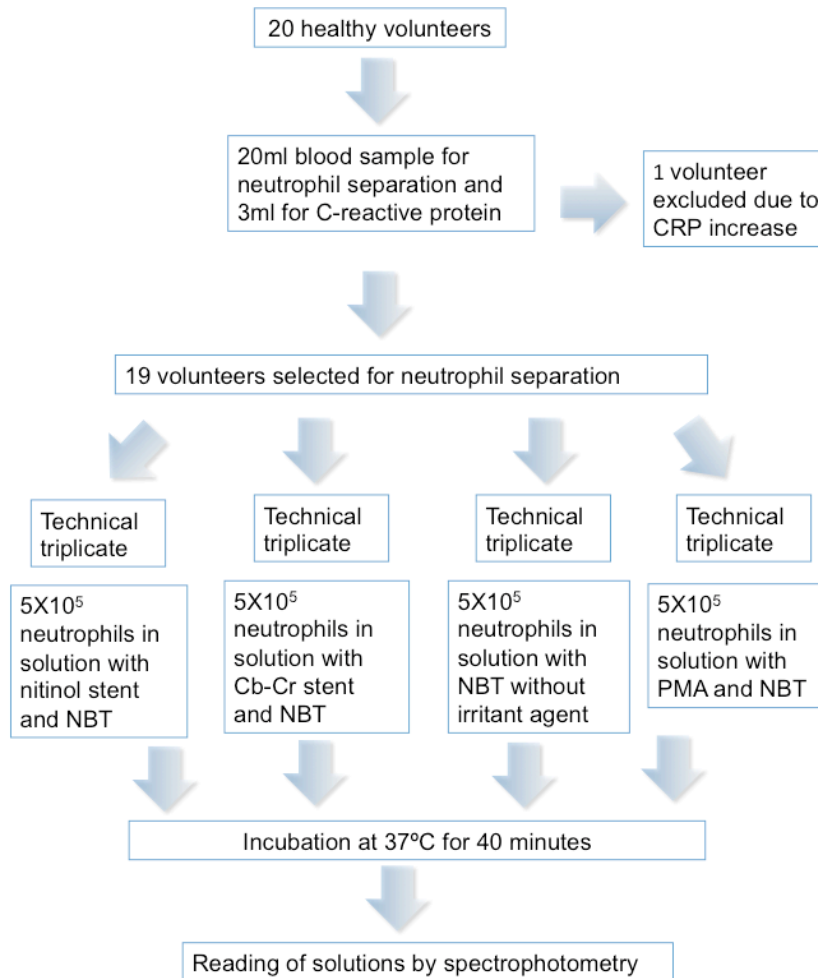
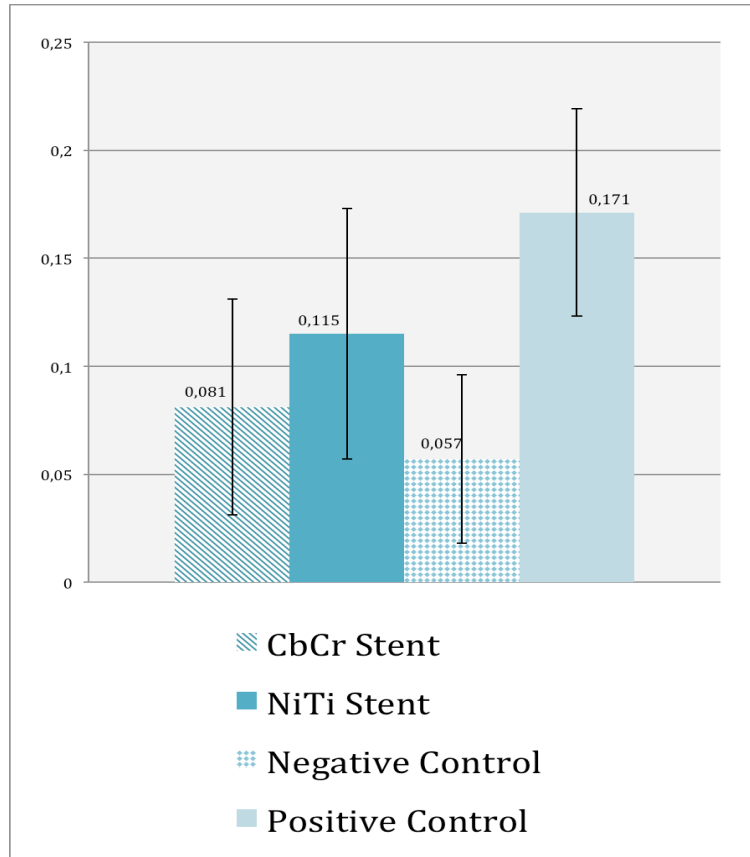
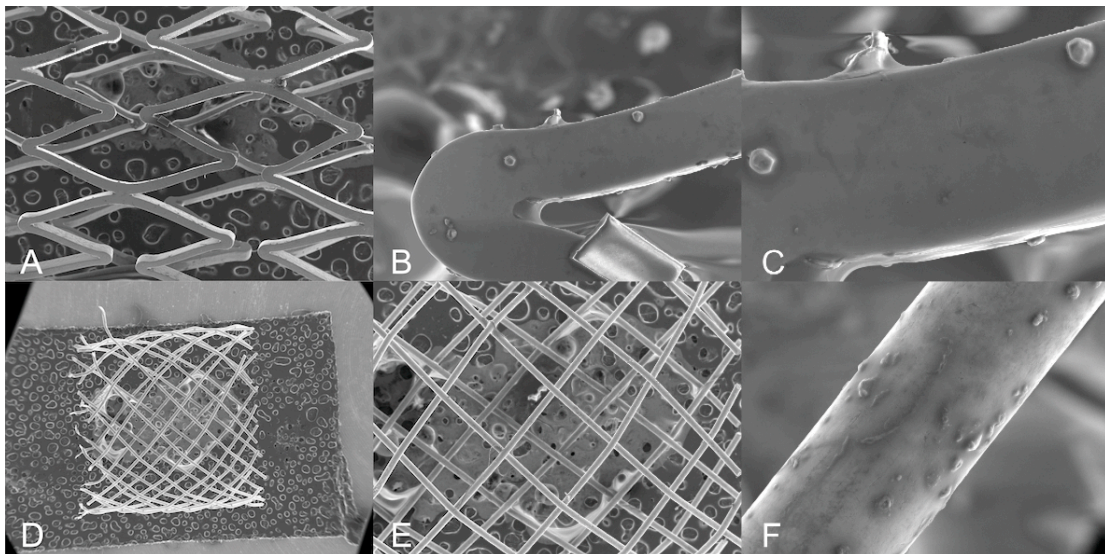


Figure 1: Study design. Subtitles: CRP: C-reactive protein; NBT: Nitro Blue Tetrazolium, PMA: 13-phorbol 12-myristate ester.





**Figure 2: Arithmetic means of the transmittance values obtained by the sample analysis of the four groups using a spectrometer.**



**Figure 3: images obtained from a scanning electron microscope. A) NT carotid stent at 23X zoom; B) NT carotid stent at 200X zoom, in which a rectangular cross section of the mesh can be observed; C) NT carotid stent at 500X zoom, in which mesh-adherent neutrophils can be observed; D) CbCr stent at 10X zoom; E) CbCr stent at 23X zoom, in which a cylindrical section of the mesh can be observed; F) CbCr stent at 500X zoom, in which the cross section and the presence of neutrophils can be observed with better definition.**

# ANEXO B – CERTIFICADO DE ENVIO PARA PARA PUBLICAÇÃO

28/10/13

ScholarOne Manuscripts



[Edit Account](#) | [Instructions & Forms](#) | [Log Out](#) | [Get Help Now](#)



[Main Menu](#) → [Author Dashboard](#) → Submission Confirmation

You are logged in as Eduardo Waihrich

## Submission Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to *American Journal of Neuroradiology*.

Manuscript ID: AJNR-13-01136

Title: ACTIVATION OF NEUTROPHILS EXPOSED TO NITINOL AND COBALT-CHROME CAROTID ARTERY STENTS IN VITRO

Authors: Waihrich, Eduardo  
Kessler, iruena  
Fontes, Wagner  
da Silva, Vitorio  
neto, oswaldo  
oliveira, Gustavo

Date Submitted: 28-Oct-2013

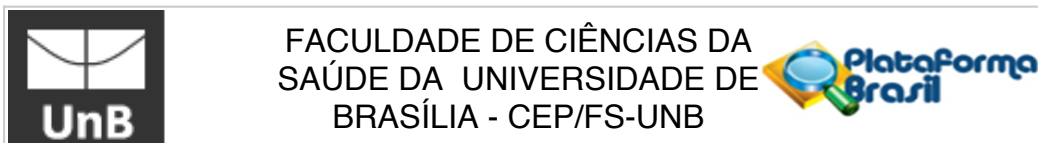
[Print](#) [Return to Dashboard](#)

ScholarOne Manuscripts™ v4.13 (patent #7,257,767 and #7,263,655). © ScholarOne, Inc., 2013. All Rights Reserved. ScholarOne Manuscripts is a trademark of ScholarOne, Inc. ScholarOne is a registered trademark of ScholarOne, Inc.

[Follow ScholarOne on Twitter](#)

[Terms and Conditions of Use](#) - [ScholarOne Privacy Policy](#) - [Get Help Now](#)

## ANEXO C – APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** ESTUDO COMPARATIVO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA DOS NEUTRÓFILOS EXPOSTOS A DIFERENTES STENTS CAROTÍDEOS

**Pesquisador:** Eduardo Siqueira Waihrich

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 16853813.4.0000.0030

**Instituição Proponente:** Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 378.351

**Data da Relatoria:** 27/08/2013

#### Apresentação do Projeto:

O projeto tem por objetivo analisar a ativação inflamatória dos neutrófilos quando expostos ao Stent Wallstente® (cromo-cobalto-titânio) e ao Stent Protegê® (nitinol), utilizando-se a produção de radicais livres, aferidos por espectrofotoscopia óptica após reação com NBT (Nitro Blue Tetrazolium). Estudo transversal com 20 pacientes hígidos e voluntários. Os paciente serão selecionados dentro do corpo clínico de médicos efetivos e residentes da Unidade de Neurocirurgia do Hospital de Base do Distrito Federal. Os pacientes terão uma amostra de 20ml de sangue coletada. A amostra será encaminhada ao laboratório para separação das células e obtenção dos neutrófilos. A separação dos leucócitos e eritrócitos será realizada utilizando gradientes de Percoll. Os neutrófilos, em solução com o NBT, serão então expostos a superfície do Stent por períodos de 40 minutos, conforme técnica previamente que validada. Após esse período as soluções serão lidas em aparelho de espectroscopia óptica com banda de 550nm. As alterações das amostras dos dois tipos diferentes de Stents serão comparadas e analisadas estatisticamente. A análise estatística será realizada pelos testes t de Student, considerando estatisticamente significativo o p menor que 0,05 com intervalo de confiança de 95%. Será utilizado o software Statplus® 2009 professional para realização dos cálculos estatísticos.

Critérios de inclusão: voluntários entre 20 e 40 anos hígidos, sem utilização de qualquer

**Endereço:** Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro  
**Bairro:** Asa Norte **CEP:** 70.910-900  
**UF:** DF **Município:** BRASILIA  
**Telefone:** (61)3107-1947 **Fax:** (61)3307-3799 **E-mail:** cepfs@unb.br



Continuação do Parecer: 378.351

medicação prévia, sem apresentar qualquer agravo agudo a saúde, selecionados entre os corpo clínico de médico residentes e efetivos da Unidade de Neurocirurgia do Hospital de Base do Distrito Federal.

Critérios de exclusão: Utilização de qualquer medicação prévia e crônica, vigência de qualquer agravo a saúde no momento da coleta dos dados e dosagem da proteína c reativa acima da normalidade.

**Objetivo da Pesquisa:**

Analisar a ativação inflamatória dos neutrófilos quando expostos ao Stent Wallstente® (cromo-cobalto-titânio) e ao Stent Protecè® (nitinol), utilizando-se a produção de radicais livres, aferidos por espectrofotoscopia óptica após reação com NBT (Nitro Blue Tetrazolium).

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Os riscos previstos são: dor, vermelhidão e discreto sangramento no ponto de perfuração por cerca de 24 horas. Em pessoas mais susceptíveis a dor, pode ocorrer tontura, enjoo e mal-estar inespecífico, logo após a coleta e de melhora espontânea. Nesses casos o participante será acompanhado por médico até a melhora total ou, se necessário, encaminhado ao HUB para avaliação.

Não há benefícios previstos.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Pesquisa laboratorial. A única participação de seres humanos é para a obtenção de neutrófilos, e a amostra será composta por médicos e residentes do hospital de base.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Foram apresentados o termo de responsabilidade do pesquisador, termo de ciência da instituição co-participante, currículo do pesquisador e TCLE redigido corretamente.

**Recomendações:**

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

O projeto está redigido com clareza e aparentemente não traz risco aos participantes. Assim, sou pela aprovação, s.m.j.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

**Endereço:** Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro  
**Bairro:** Asa Norte **CEP:** 70.910-900  
**UF:** DF **Município:** BRASÍLIA  
**Telefone:** (61)3107-1947 **Fax:** (61)3307-3799 **E-mail:** cepts@unb.br



FACULDADE DE CIÊNCIAS DA  
SAÚDE DA UNIVERSIDADE DE  
BRASÍLIA - CEP/FS-UNB



Continuação do Parecer: 378.351

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

BRASILIA, 30 de Agosto de 2013

---

**Assinador por:**  
**Natan Monsores de Sá**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro  
**Bairro:** Asa Norte **CEP:** 70.910-900  
**UF:** DF **Município:** BRASILIA  
**Telefone:** (61)3107-1947 **Fax:** (61)3307-3799 **E-mail:** cepfs@unb.br