



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MÁRCIO FRANCISCO LEHMANN

**ESTUDO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM PACIENTES
COM ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL ISQUÊMICO
AGUDO (AVCI):
SUA RELAÇÃO COM OS SUBTIPOS DE AVCI, DÉFICIT
NEUROLÓGICO E EVOLUÇÃO CLÍNICA**

Londrina
2015

MÁRCIO FRANCISCO LEHMANN

**ESTUDO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM PACIENTES
COM ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL ISQUÊMICO
AGUDO (AVCI):
SUA RELAÇÃO COM OS SUBTIPOS DE AVCI, DÉFICIT
NEUROLÓGICO E EVOLUÇÃO CLÍNICA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof.^a. Dra. Edna Maria Vissoci Reiche (Dept^o PAC/CCS/UEL)

Londrina
2015

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

L523e Lehmann, Márcio Francisco.

Estudo da resposta inflamatória em pacientes com acidente vascular cerebral isquêmico agudo (AVCI) : sua relação com os subtipos de AVCI, déficit neurológico e evolução clínica / Márcio Francisco Lehmann. – Londrina, 2015. 122 f. il.

Orientador: Edna Maria Vissoci Reiche.

Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2015.

Inclui bibliografia.

1. Acidentes vasculares cerebrais – Teses. 2. Isquemia cerebral – Teses. 3. Fator de necrose de tumor – Teses. 4. Inflamação – Teses. I. Reiche, Edna Maria Vissoci. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDU 616.831

MÁRCIO FRANCISCO LEHMANN

**ESTUDO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM PACIENTES COM
ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL ISQUÊMICO AGUDO (AVCI):
SUA RELAÇÃO COM OS SUBTIPOS DE AVCI, DÉFICIT
NEUROLÓGICO E EVOLUÇÃO CLÍNICA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa Dra. Edna Maria Vissoci
Reiche
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Damacio Ramón Kaimen-Maciel
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Isaias Dichi
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa Dra. Mônica Marcos de Souza
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Paulo Henrique Pires de Aguiar
Universidade Estadual de São Paulo – USP

Profa Dra. Andréa Name Colado Simão
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Ferri Junior
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 26 de fevereiro de 2015.

AGRADECIMENTOS

À minha esposa Ana Lucia, meus filhos Bruno e Caio e meus pais Johnny e Christina.

À minha orientadora Professora Dra. Edna Maria Vissoci Reiche.

Ao professor Dr. Damacio Ramón Kaimen-Maciel.

Aos professores Dra. Andréa Name Colado Simão, Dr. Marcell Alysson Batisti Lozovoy.

Aos alunos do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina Daniela Frizon Alfieri, Francieli Delongui, Ana Paula Kallaur, Sayonara Rangel Oliveira, Tamires Flauzino, Johnathan de Sousa Parreira, Thiago Hissnauer Leal Baltus, Lucas Silva Liberatti, Jorge Paulo Sales de Almeida.

Aos alunos do Curso de Graduação em Medicina da Universidade Estadual de Londrina Maria Caroline Martins de Araújo, Erick Frank Bragato, Carolina Rossato, Jéssica Tavares de Almeida, Larissa Muliterno Pelegrino, Luiz Antonio Vesco Gaiotto.

Aos alunos do Curso de Graduação em Farmácia da Universidade Estadual de Londrina Micheli Voltarelli, Milena Zardetto Meloni, Gabriel de Araújo Costa.

Aos funcionários dos Setores de Coleta e de Imunologia Clínica do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina.

À *Bayer Health Care* e *Alpha Medical* pelo auxílio financeiro.

Aos pacientes e seus familiares.

Lehmann, Márcio Francisco. **Estudo da resposta inflamatória em pacientes com acidente vascular cerebral isquêmico agudo (AVCI): sua relação com os subtipos de AVCI, déficit neurológico e evolução clínica.** 2015. 122 f. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2015.

RESUMO

O acidente vascular cerebral isquêmico (AVCI) é uma das principais causas de morte e incapacidade em todo o mundo. As vias fisiológicas do metabolismo lipídico, resposta inflamatória crônica, coagulação e hemostasia, regulação da pressão sanguínea e adesão celular têm sido implicadas na fisiopatologia do AVCI em estudos realizados em diferentes populações mundiais. O objetivo deste estudo foi avaliar a associação entre os marcadores demográficos, epidemiológicos, inflamatórios e metabólicos com os subtipos de AVCI, déficit neurológico e evolução clínica em pacientes com AVCI agudo da população brasileira. O estudo incluiu 121 pacientes com atendidos no Pronto Socorro do Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina, Londrina, e 96 indivíduos saudáveis controlados por idade, sexo, etnia e índice de massa corpórea (IMC) provenientes da mesma região geográfica. Foram coletados dados demográficos, antropométricos, clínicos e fatores de risco associados ao AVCI. O subtipo de AVCI foi classificado segundo os critérios de TOAST em aterosclerose de grandes artérias (*large artery atherosclerosis stroke*, LAAS), infarto cardioembólico (*cardioembolic infarct*, CEI), infarto lacunar (*lacunar infarct*, LAC), AVCI de outra etiologia determinada (*other determined etiology*, ODE) e AVCI de etiologia indeterminada (*undetermined etiology*, UDE). A capacidade funcional dos pacientes foi avaliada no momento da admissão pela Escala de Rankin Modificada (mRS) e após três meses de evolução. Amostras de sangue periférico foram coletadas em até 24 horas após o diagnóstico de AVCI para a determinação da contagem de leucócitos periféricos e plaquetas, velocidade de hemossedimentação (VHS), níveis séricos de proteína C reativa ultrasensível (usPCR), ferritina e homocisteína, níveis plasmáticos de interleucina 6 (IL-6), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e da metaloproteinase de matrix 9 (MMP-9). Foram analisados também níveis séricos de ferro, colesterol total (CT), triglicerídeos (TG), lipoproteína de alta densidade do colesterol (HDL-C), lipoproteína de baixa densidade do colesterol (LDL-C) e níveis plasmáticos de glicose e insulina. A resistência à insulina foi avaliada pelo Modelo de Avaliação da Homeostase para Resistência à Insulina (*Homeostasis Model Assessment for Insulin Resistance*, HOMA-IR). Entre os pacientes, 68 (56,2%) eram homens e os riscos modificáveis mais frequentes para AVCI foram hipertensão (87/71,2%), sedentarismo (68/56,2%), dislipidemia (45/37,2%), diabetes (45/37,2%) e tabagismo (26/21,5%). Segundo os subtipos do AVCI, 35 (28,9%) pacientes apresentaram LAAS, 21 (17,3%) CEI, 39 (32,2%) LAC, 8 (6,6%) ODE e 18 (14,9%) UDE. Quando os subtipos foram comparados aos controles, a frequência de homens foi maior entre os que tiveram LAAS, LAC e CEI ($p < 0,0001$, $p = 0,0016$ e $p = 0,0016$, respectivamente); os não Caucasianos foram mais frequentes entre os que apresentaram LAAS ($p = 0,0039$); hipertensão foi mais frequente entre os pacientes com LAAS, LAC e CEI ($p = 0,0095$, $p = 0,0404$ e $p = 0,0234$, respectivamente); diabetes foi mais frequente entre os pacientes com LAAS ($p = 0,0216$); sedentarismo foi mais frequente entre os pacientes com LAAS, LAC e CEI ($p < 0,0001$); tabagismo foi mais frequente entre os

que tiveram LAAS e LAC ($p=0,0007$ e $p=0,0400$, respectivamente); uso de antihipertensivos foi mais frequente entre os que tiveram LAAS e LAC ($p=0,0021$ e $p=0,0218$, respectivamente); e o uso de anti-paquetários foi mais frequentes entre os que tiveram LAC ($p=0,0062$). Ainda comparados aos controles, os leucócitos periféricos e os níveis de usPCR, IL-6, MMP-9 e glicemia foram mais elevados nos pacientes com LAAS, LAC e CEI ($p<0,05$) e os níveis de HDL-C e ferro foram menores nos pacientes com LAAS, LAC e CEI ($p<0,01$); insulina, HOMA-IR e homocisteína foram mais elevados nos que tiveram LAC ($p<0,0001$) e CT foi menor nos pacientes com LAAS e CEI ($p<0,01$ e $p<0,0001$, respectivamente). O déficit neurológico foi mais elevado nos pacientes com LAAS vs. LAC [6,0 (4,0-5,0) vs 4,0 (3,0-4,0), respectivamente, $p<0,001$]; Caucasianos foram mais frequentes entre os pacientes com LAC ($p=0,0045$) e a taxa de mortalidade foi mais elevada entre os pacientes com LAAS que naqueles com LAC (45,7% vs 20,5%, $p=0,0391$, OR 3,263 (95%CI: 1,173-9,078). Os marcadores inflamatórios avaliados não diferiram entre os subtipos de AVCI ($p>0,05$); a insulina foi mais elevada nos pacientes com LAAS vs. LAC ($p<0,05$) e nos pacientes com LAC vs. CEI ($p<0,05$) e os níveis de CT foram menores nos pacientes com LAC vs. CEI ($p<0,05$). O estudo demonstrou, também, que a VHS foi mais elevada nos pacientes com déficit neurológico moderado/grave ($p<0,05$) e nos com déficit neurológico leve ($p<0,05$) comparados aos controles. Níveis de usPCR e IL-6 foram mais elevados nos pacientes com $mRS \geq 3$ comparados aos controles ($p<0,0001$, $p<0,05$ e $p<0,0001$, respectivamente) e comparados aos pacientes com $mRS < 3$ ($p<0,05$). Os níveis de ferritina foram mais elevados nos pacientes com $mRS \geq 3$ que nos controles ($p<0,0001$); no entanto, não diferiram entre os pacientes com AVCI. Verificou-se uma correlação positiva entre o déficit neurológico na admissão com leucócitos periféricos ($r=0.2588$, $p=0.0061$), VHS ($r=0.3832$, $p=0.0002$), usPCR ($r=0.3777$, $p<0.0001$) e IL-6 ($r=0.3332$, $p=0.0011$). VHS, usPCR e IL-6 também apresentaram correlação positiva com a diferença entre os escores do mRS obtidos na admissão e após três meses de seguimento ($r=0.2758$, $p=0.03298$; 0.2491 , $p=0.0207$ e $r=0.3549$, $p=0.0007$, respectivamente). O deficit neurológico, leucócitos periféricos, usPCR, IL-6 e MMP-9 obtidos na admissão dos pacientes apresentaram significativa associação com o desfecho após três meses do AVCI ($p<0,0001$, $p=0,0117$, $p=0,0074$, $p<0,0001$ e $p=0,0435$, respectivamente), sendo mais elevados nos pacientes que não sobreviveram comparados aos que sobreviveram. Em conclusão, hipertensão, sedentarismo, aumento de leucócitos periféricos, usPCR, IL-6 e MMP-9, assim como hiperglicemia e baixos níveis de HDL-C e ferro foram associados com os subtipos LAAS, LAC e CEI de AVCI. O deficit neurológico e o aumento dos níveis séricos deste marcadores inflamatórios foram associados com a mortalidade dos pacientes com AVCI. Os resultados confirmam a extensa resposta inflamatória e alterações metabólicas associadas ao AVCI. Estas moléculas exercem importante papel na patogênese e evolução clínica do AVCI e podem ser consideradas como marcadores do perfil inflamatório e metabólico que contribuem para o desenvolvimento e evolução clínica do AVCI. Podem, também, serem utilizadas na avaliação dos pacientes na sua admissão hospitalar e, assim, identificar os que podem se beneficiar com estratégias terapêuticas anti-inflamatórias que levem em consideração a magnitude destas alterações após o evento isquêmico.

Palavras-chave: Acidente vascular cerebral. Inflamação. Interleucina 6. Fator de necrose tumoral alfa. Metaloproteinases (MMPs). Escala de Rankin modificada.

Lehmann, Marcio Francisco. **Study of inflammatory response in patients with acute ischemic stroke:** their relationship with stroke subtypes, functional impairment, and outcome. 2015. 122 p. Doctoral Thesis. Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2015.

ABSTRACT

Ischemic stroke is a major cause of death and long-term adult disability worldwide. Physiological pathways of lipid metabolism, chronic inflammatory response, systemic coagulation, blood pressure regulation, and cell adhesion have been implicated in the pathophysiology of stroke and these biomarkers have been evaluated in different population worldwide. The aim of this study was to evaluate the relationship between demographical, epidemiological, inflammatory, and metabolic markers and the ischemic stroke subtypes, neurological deficit, and outcome of 121 patients with acute ischemic stroke attended at the Emergency Room of the University Hospital of Londrina. Ninety-six healthy individuals age, sex, ethnicity, and body mass index (BMI) controlled were included. The subtype of ischemic stroke was classified according to TOAST criteria, such as large artery atherosclerosis (LAAS), lacunar infarct (LAC), cardioembolic infarct (CEI), stroke of other determined etiology (ODE), and stroke of undetermined etiology (UDE). The baseline neurological deficit of patients up to eight hours of the stroke and after three-month follow-up were evaluated using the modified Rankin Scale (mRS). Blood samples were obtained up to 24 hours of stroke to evaluate peripheral leukocyte and platelet counts, erythrocyte sedimentation rate (ESR), interleukin 6 (IL-6), tumor necrosis factor alpha (TNF- α), serum high sensitivity C-reactive protein (hsCRP), ferritin, homocystein, matrix metalloproteinase 9 (MMP-9), total cholesterol (TC), triglycerides (TG), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), iron, glucose, and insulin. The Homeostasis Model Assessment for Insulin Resistance (HOMA-IR) was also evaluated. The stroke patients comprised of 68 (56.2%) men and the most common modifiable risk factors for stroke were hypertension (87/71.2%), sedentarism (68/ 56.2%), dyslipidemia (45/ 37.2%), diabetes (45/ 37.2%), and smoking (26/ 21.5%). Thirty-five 35 (28.9%) patients were classified as LAAS, 21 (17.3%) as CEI, 39 (32.2%) as LAC, 8 (6.6%) as ODE, and 18 (14.9%) as UDE subtypes. When the stroke subtypes were compared with controls, the frequency of men was higher among those with LAAS, LAC, and CEI ($p < 0.0001$, $p < 0.0016$, and $p < 0.0016$, respectively); the Non Caucasians were more frequent among those with LAAS ($p = 0.0039$); hypertension was more frequent among those with LAAS, LAC, and CEI ($p = 0.0095$, $p = 0.0404$, and $p = 0.0234$, respectively); sedentarism was also more frequent among those with LAAS, LAC, and CEI ($p < 0.0001$); smoking was more frequent among those with LAAS and LAC ($p = 0.0007$ and $p = 0.0400$, respectively); diabetes was more frequent among those with LAAS ($p = 0.0216$); the use of antihypertensive drugs before the stroke was more frequent among those with LAAS and LAC ($p = 0.0021$ and $p = 0.0218$, respectively), and the use of antiplatelets drugs before the stroke was more frequent among those with LAC ($p = 0.0062$). Comparing to controls, peripheral leukocytes, hsCRP, IL-6, MMP-9, and glucose were higher among those with LAAS, LAC, and CEI ($p < 0.05$), and HDL-C levels and iron were lower among those with LAAS, LAC, and CEI ($p < 0.0001$); insulin, HOMA-IR, and homocystein were higher among those with LAC ($p < 0.0001$),

and TC was lower among those with LAAS and CEI ($p < 0.01$ and $p < 0.0001$, respectively). When the different stroke subtypes were compared, Caucasians were more frequent among those with LAC vs. LAAS ($p = 0.0045$); neurological deficit was higher among those with LAAS vs. LAC [6.0 (4.0-5.0 vs. 4.0 (3.0-4.0), respectively, $p < 0.0001$]; and higher rate of mortality was obtained among those with LAAS vs. LAC (45.7% vs. 20.5%, $p = 0.0391$, OR: 3.263, 95% CI: 1.173-9.078); insulin was higher in LAAS vs. LAC ($p < 0.05$) and in LAC vs. CEI ($p < 0.05$); TC was lower in LAAS vs. LAC ($p < 0.05$). Compared with controls, patients with mild disability showed higher peripheral leukocytes ($p < 0.0001$), IL-6 ($p < 0.05$), and MMP-9 ($p < 0.05$); and those with moderate/severe disability presented higher peripheral leukocytes, hsCRP, ferritin, MMP-9 ($p < 0.0001$), ESR and IL-6 ($p < 0.05$). When the patients were compared according to their neurological deficit, those with moderate/severe disability were predominantly male ($p < 0.01$), presented higher values of ESR, hsCRP, and IL-6 ($p < 0.05$) than those with mild disability. Positive correlation was obtained between ESR, hsCRP, IL-6, and MMP-9 with the difference of the mRS on admission and after three-month follow-up ($r = 0.2758$, $p = 0.03298$; $r = 0.2491$, $p = 0.0207$; $r = 0.3549$, $p = 0.0007$; $r = 0.2554$, $p = 0.0342$, respectively). An association was observed between the neurological deficit, peripheral leukocytes, hsCRP, IL-6, and MMP-9 on admission of the patients with the rate of mortality after three-month follow-up, with higher levels of these inflammatory markers among the non survivors than survivors ($p < 0.0001$, $p = 0.0117$, $p = 0.0074$, $p < 0.0001$, and $p = 0.0435$, respectively). In conclusion, hypertension, sedentarism, increased peripheral leukocytes, usCRP, IL-6, MMP-9, as well as hyperglycemia, and low levels of HDL-C and iron were associated with LASS, LAC, and CEI stroke subtypes. Moderate/severe neurological deficit and increased levels of these inflammatory markers were associated with mortality of the stroke patients. Taken together, the results underscored the extent inflammatory response and metabolic changes associated with acute ischemic stroke. These molecules may exert an important role in the pathogenesis and outcome of acute ischemic stroke and might be considered as markers of development and outcome of stroke. Moreover, these markers might be useful to the initial evaluation of stroke patients on admission at hospital and, at this way, to identify those that could benefit with therapeutical strategies that taken into account the magnitude of these changes after the acute ischemic stroke.

Key words: Ischemic stroke. Inflammation. Interleukin 6. Tumor necrosis factor alpha. Metalloproteinases (MMPs). Modified rankin scale.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAS	Ácido acetilsalicílico
AP-1	Ativador de proteína 1
AVC	Acidente vascular cerebral
AVCI	Acidente vascular cerebral isquêmico
BBB	<i>Blood Brain Barrier</i> - Barreira hematoencefálica
BHE	Barreira hematoencefálica
BMI	<i>Body Mass Index</i> - Índice de massa corpórea
CBS	Cistationina Beta Sintetase
CEI	<i>Cardioembolic Infarct</i> - Infarto cardioembólico
CT	Colesterol total
CT	<i>Computed Tomography</i> - Tomografia computadorizada
DAC	Doença arterial coronariana
DNA	Deoxyribonucleic acid- Ácido desoxirribonucleico
ECM	<i>Extracellular matrix</i> - Matriz extracelular
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i> - Fator de crescimento epidérmico
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EUA	Estados Unidos da América
FSC	Fluxo sanguíneo cerebral
GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i> - Proteína ácida fibrilar glial
IC	Intervalo de confiança
ICAM-1	<i>Intrecellular adhesion molecule 1</i> - Molécula de adesão intercelular 1
ICAM-2	<i>Intrecellular adhesion molecule 2</i> - Moléculas de adesão intercelular 2
IDH	Índice de Desenvolvimento Humano
IL-6	<i>Interleukin 6</i> - Interleucina 6
iNOS	<i>Induced nitric oxide synthase</i> - Óxido nítrico sintetase induzida
IAM	Infarto agudo do miocárdio
IMC	Índice de massa corpórea
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HDL-C	<i>High-density lipoprotein cholesterol</i> - Lipoproteína de alta densidade
HOMA-IR	<i>Homeostasis model assessment for insulin resistance</i> - Modelo de avaliação da homeostase para resistência à insulina

kDa	Kilodalton
LDL-C	<i>Low-density lipoprotein cholesterol</i> - Lipoproteína de baixa densidade
LAAS	<i>Large artery atherosclerosis</i> - Aterosclerose de grandes artérias
LAC	<i>Lacunar infarct</i> - Infarto lacunar
LES	Lúpus eritematoso sistêmico
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LOO	Radical peróxido
MAdCAM-1	<i>Human mucosal addressin cell adhesion molecule-1</i> - Molécula de adesão celular da adressina da mucosa vascular
MAKP	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i> – Proteína quinase ativada por mitógenos
MMP	<i>Matrix metalloproteinase</i> - Metaloproteinases de matriz
mRS	<i>Modified Rankin Scale</i> - Escala de Rankin modificada
MTHFR	Metilenoetrahidrofolato redutase
MS	Metionina sintetase
NHANES	<i>National Health Nutrition Examination Survey</i>
NIHSS	<i>National Institute Health Stroke Scale</i>
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa B</i> - Fator nuclear kappa B
NGF	<i>Nerve Growth Factor</i> – Fator de crescimento de nervo
NO	<i>Nitric oxide</i> - Óxido nítrico
O ₂ [•]	Ânio superóxido
OH ⁻	Radical hidroxila
ODE	<i>Other determined etiology</i> - AVC de outra etiologia determinada
ONOO ⁻	Peroxinitrito
ONU	Organização Nações Unidas
OR	<i>Odds ratio</i> – razão de chaces
PECAM-1	<i>Platelet endothelial cell adhesion molecule 1</i> - Molécula de adesão celular endotelial plaquetária tipo 1
PDGF	<i>Platelet-derived Growth Factor</i> – Fator de crescimento derivado de plaquetas
PVW	<i>Pulse wave velocity</i> – Velocidade da onda de pulso
rhIL-1ra	<i>Recombinant human interleukin-1 receptor antagonist</i> – Antagonista do receptor de IL-1 humano recombinante

RNM	Ressonância nuclear magnética
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> - Espécies de oxigênio reativo
rtPA	<i>Recombinant Tissue Plasminogen Activator</i> – Ativador de plasminogenio tecidual recombinante
SNC	Sistema nervoso central
TC	Tomografia computadorizada
TG	Triglicerídeos
TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i> - Fator de crescimento transformador beta
TIMPS	Inibidores tissulares da matrix metaloproteinase
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor alpha</i> - Fator de necrose tumoral alfa
TOAST	<i>Trial of Org in10172 Acute Stroke</i>
tPA	Ativador de plasminogenio tecidual
UDE	<i>Undetermined etiology</i> - AVC com etiologia indeterminada
usPCR	Proteína C reativa ultrasensível
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule1</i> - Molécula de adesão celular vascular 1
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> – Fator de crescimento endotelias vascular
VHS	Velocidade de hemossedimentação
VLDL	<i>Very low-density lipoprotein</i> - Lipoproteína de muito baixa densidade
VWF	<i>von Willebrand factor</i> - Fator de von Willebrand

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	AVCI E RESPOSTA INFLAMATÓRIA	18
1.1.1	Células Inflamatórias	20
1.1.2	Moléculas de Adesão Celular	22
1.1.3	Citocinas	23
1.1.4	Metaloproteinases de Matrix (MMPs)	26
1.1.5	Proteínas de Fase Aguda Positivas	29
1.2	Alterações Metabólicas e AVCI.....	33
1.2.1	Hiperhomocisteinemia	33
1.2.2	Metabolismo Lipídico e de Carboidratos.....	34
1.3	TRATAMENTO DO AVC.....	35
2	JUSTIFICATIVA	37
3	OBJETIVOS	38
3.1	OBJETIVO GERAL	38
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
4	MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1	ASPECTOS ÉTICOS	39
4.2	DELINEAMENTO	39
4.3	POPULAÇÃO.....	39
4.4	AMOSTRA	39
4.5	CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	41
4.6	EXAMES LABORATORIAIS.....	41
4.6.1	Marcadores Inflamatórios.....	42
4.6.2	Marcadores Metabólicos.....	42
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	43
5	RESULTADOS	44
	ARTIGO 1	45

ARTIGO 2	71
6 CONCLUSÕES	100
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	102
REFERENCIAS	103
ANEXOS	113
ANEXO 1A – PROTOCOLO DE ATENDIMENTO PRÉ-HOSPITALAR DE PACIENTES COM ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL	114
ANEXO 1B – FLUXOGRAMA DE ATENDIMENTO DO ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL AGUDO	115
ANEXO 2 – APROVAÇÃO PELO COMITE DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS DA UEL.....	116
ANEXO 3A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA GRUPO DE PACIENTES COM AVC	117
ANEXO 3B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA GRUPO DE CONTROLES	119
ANEXO 4 – QUESTIONÁRIO PARA COLETA DE DADOS PACIENTES E CONTROLES.....	121

1 INTRODUÇÃO

O acidente vascular cerebral (AVC) é uma das principais causas de morte e incapacidade no mundo com forte impacto econômico e social. As doenças cérebro vasculares são a segunda causa de morte no mundo e a primeira causa de mortalidade no Brasil (ALMEIDA; DAL PIZZOL; VALLER, 2012).

O AVC é definido como uma súbita perda de função cerebral resultante de interferência no suprimento sanguíneo e é segunda maior causa de mortalidade e morbidade, principalmente na população acima dos 55 anos de idade (ALMEIDA; DAL PIZZOL, VALLER, 2012). O *National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES)* indica que 6,8 milhões de norte-americanos (2,8% da população) maiores de 20 anos têm diagnóstico relacionado a AVC. A cada ano 795.000 pessoas sofrem um episódio de AVC (610.000 casos novos / 185.000 casos recorrentes). Isso equivale a um novo AVC a cada 40 segundos nos Estados Unidos da América (EUA), A cada ano 55.000 mais mulheres que homens têm AVC. Mulheres vivem mais tempo na faixa etária de risco para AVC. Projeções indicam que esse número deve chegar a 10 milhões de vítimas em 2030 nos EUA (GO et al., 2014).

No Brasil, o AVC ocorre com maior frequência na faixa etária superior a 50 anos, sendo responsável por 10% do total de óbitos, 32,6% das mortes com causas vasculares e 40% das aposentadorias precoces no Brasil. O país está entre os dez primeiros com maiores índices de mortalidade por AVC (ABRAMCZUK; VILLELA, 2009). Em 2010, segundo dados do Ministério da Saúde, o AVC foi responsável por 52,3 óbitos em 100 mil habitantes, representando 10% das internações em hospitais públicos (BRASIL, 2013). Os óbitos de pessoas com idades entre 20 e 59 anos corresponderam a 31,1% do total de óbitos captados pelo Sistema de Informações de Mortalidade (SIM) em 2010, com maior proporção de mortes entre homens e no grupo etário de 50 a 59 anos. As principais causas de morte de adultos com idades entre 20 e 59 anos, no Brasil, foram os homicídios e os acidentes de transporte terrestre (ATT's), seguidos pelas doenças isquêmicas do coração, doenças cerebrovasculares, cirrose e outras doenças crônicas do fígado. Apesar disso, a população desconhece a doença, os fatores de risco são mal controlados, poucos centros têm a estrutura e a organização necessárias para atender e tratar, de

maneira adequada, os pacientes em fase aguda da doença e poucos locais oferecem reabilitação a estes pacientes (CABRAL, 2009).

Os dados são alarmantes, mas o Brasil vem seguindo uma tendência já observada nos países desenvolvidos de queda das taxas de mortalidade por AVC. Assim como a incidência, a mortalidade, nos últimos 30 anos, em países desenvolvidos, tem declinado, principalmente, no Japão, América do Norte e Europa Ocidental e, na última década, também na Europa Oriental, porque são locais onde surgem e primeiro se disseminam os novos métodos preventivos (ABRAMCZUK, VILLELA, 2009). As curvas das taxas de mortalidade nos países em desenvolvimento, especialmente na América Latina, têm diminuído, ainda que menos pronunciadamente do que nos Estados Unidos e Canadá. Utilizando dados oficiais de atestados de óbitos, um estudo das taxas de mortalidade por AVC no Brasil, comparando o início das décadas de 1980, 1990 e 2000, demonstrou um declínio de 68,2 para 40,9 por 100.000 habitantes no período, com variações regionais (CABRAL, 2009).

No entanto, o total de óbitos atribuídos ao AVC, em números absolutos, tem aumentado nas três últimas décadas. A aparente contradição se deve ao aumento da expectativa de vida da população. Como os idosos representam o grupo mais acometido pela doença, o número total de óbitos por AVC cresce em paralelo com o fenômeno demográfico (ABRAMCZUK, VILLELA, 2009).

Dados obtidos na população dos EUA indicam que, a cada quatro minutos, alguém morre de AVC nos EUA e, em 2009, uma a cada 19 mortes naquele país foi causada por AVC. Aproximadamente, 56% das mortes por AVC ocorreram fora do hospital e mulheres morrem mais de AVC pois são acometidas em idade mais avançada. A faixa de maior mortalidade é aproximadamente aos 79 anos (GO et al, 2014).

Cerca de 15% dos casos de AVC foram precedidos de um acidente isquêmico transitório (AIT). Dos pacientes que sofreram um AIT, 12% morrerão em um ano (GO et al., 2014).

A taxa de mortalidade bruta mostrou uma discreta diminuição, que foi mais evidente no sexo masculino, enquanto a taxa de mortalidade padronizada mostrou uma redução mais acentuada, especialmente entre as mulheres. Mesmo constatada essa tendência de redução da taxa de mortalidade por AVC no Brasil, os valores continuam elevados, sendo superiores aos dos países desenvolvidos e aos da

América Latina. Os motivos para explicar a redução da taxa de mortalidade por AVC estão intimamente ligados à incidência e letalidade da doença (CABRAL, 2009).

Os fatores de risco cardiovasculares modificáveis incluem hipertensão artérias sistêmica, dislipidemia, diabetes melito, obesidade, sedentarismo, tabagismo, etilismo, fibrilação atrial, AVC e AIT prévio, uso de anticoncepcional oral e estenose carotídea. Os não modificáveis incluem idade, sexo, etnia e genéticos (JICKLING et al., 2010); destes, a idade é o mais importante (ROSAMOND et al., 2008; ALMEIDA; DAL PIZZOL; VALLER, 2012).

Transtornos respiratórios do sono têm sido cada vez mais reconhecidos como fatores de risco para AVC. Pacientes com AVC têm maior prevalência de apneia do sono que podem ter precedida ou desenvolvida como resultado de um AVC (CULEBRAS, 2015). Apnéia do sono também tem sido associada com múltiplos fatores maiores de risco para AVC, como a hipertensão e fibrilação atrial que respondem favoravelmente ao tratamento bem sucedido da apnéia do sono (CULEBRAS, 2015). Um estudo recente demonstrou que a apnéia obstrutiva do sono, em pacientes com fibrilação atrial, é um fator preditor independente de AVC (YARANOV et al., 2015). Apnéia do sono não tratada é associada a pior prognóstico funcional após o AVC e o seu tratamento adequado melhora a recuperação do paciente e reduz o risco de recorrência (DAVIS et al, 2013). Outro estudo verificou que a apnéia obstrutiva do sono está associada com menor estado funcional e cognitivo em pacientes admitidos para reabilitação após AVC e a sugere como um provável fator prognóstico (AARONSON et al., 2014) nestes pacientes.

A incidência do AVC está relacionada aos fatores de risco como a hipertensão arterial, diabetes, obesidade, tabagismo, Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) elaborado pela Organização das Nações Unidas (ONU), entre outros, enquanto a letalidade avalia a eficácia do tratamento instituído (CABRAL, 2009). O controle dos fatores de risco, a prevenção primária e secundária das doenças circulatórias e a melhoria das condições socioeconômicas da população podem levar a uma queda da mortalidade. Além disso, procedimentos de alta tecnologia (exemplo: angioplastia), maior número de equipamentos nos hospitais para o diagnóstico mais preciso, como tomografia computadorizada (TC) do crânio e ressonância nuclear magnética (RNM), e atendimentos mais rápidos também contribuem para a redução da mortalidade. No entanto, pelas suas dimensões, no Brasil há uma grande desigualdade regional, além de os recursos destinados à saúde pública serem

escassos, não sendo possível que a população de algumas localidades seja contemplada com esses procedimentos (GARRITANO et al., 2012).

Estudos da *American Heart Association* (AHA) indicam que negros apresentem risco de AVC duas vezes maior que outras etnias (AHA, 2009). Observa-se nítida relação entre o nível socioeconômico e a prevalência de AVC. As regiões periféricas e menos favorecidas das grandes cidades apresentam um número significativamente maior de casos de AVC, sugerindo que o impacto dessa doença em áreas desprovidas de recursos pode ser ainda maior (GARRITANO et al., 2012).

Cerca de 85% dos AVC são isquêmicos (AVCI) e decorrentes de uma obstrução arterial encefálica. Dos 15% restantes, 10% são decorrentes de hemorragia intracerebral espontânea e 5% de hemorragia subaracnóidea (GO et al., 2014). O AVCI, por sua vez, apresenta três etiologias principais: doença aterosclerótica de grandes artérias, doença de pequenos vasos e cardioembolia. Além dessas, existem inúmeras outras causas, como vasculites, trombofilias, anemia falciforme, dissecação arterial e doenças genéticas. Em até 30% dos casos, a etiologia não pode ser definida. As principais causas relacionadas às hemorragias intracerebral espontânea e subaracnóidea são, respectivamente, a hipertensão arterial sistêmica e os aneurismas e malformações arteriovenosas cerebrais (ROSAMOND et al., 2008).

A classificação do AVCI em categorias e subcategorias é fundamental para o diagnóstico, tratamento e prevenção da doença. Do ponto de vista etiológico, a mais utilizada é definida pelo *Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment* (TOAST), publicada em 1993 (ADAMS et al., 1993), que inclui 5 categorias dependendo dos dados clínicos, dos exames laboratoriais e de imagem. Esta classificação merece destaque por sua praticidade e utilidade nos estudos que buscam os fatores de riscos genéticos para a doença e suas influências na evolução clínica.

1) **Aterosclerose de grandes artérias:** (*large artery atherosclerosis, LAAS*) é caracterizada por estenose (>50%) ou oclusão de uma artéria cerebral maior ou de um ramo cortical, presumivelmente, causada pela aterosclerose;

2) **Infartos cardioembólicos** (*cardioembolic infarct, CEI*): caracterizado por oclusões causadas por êmbolos provenientes do coração;

3) **Infartos lacunares** (*lacunar infarct, LAC*): oclusão de pequeno vaso, identificado em pacientes diabéticos e hipertensos clinicamente, síndromes lacunares, apresentando exames de imagem (TC ou RMN) normais ou com lesões relevantes subcorticais hemisféricas ou no tronco cerebral com diâmetro menor que 1,5 cm;

4) **AVC com outra etiologia determinada** (*stroke of other determined etiology, ODE*): engloba pacientes com causas raras de AVC, como as vasculopatias não ateroscleróticas, estados de hipercoagulação ou desordens hematológicas. Os pacientes devem ter achados clínicos e TC ou RMN de AVC isquêmico agudo independentes do tamanho ou localização;

5) **AVC com etiologia indeterminada** (*stroke of undetermined etiology, UDE*): em várias situações, a causa do AVC isquêmico não pode ser determinada com algum grau de confiabilidade, a despeito de extensiva investigação.

O AVCI pode também ser classificado em 4 subtipos, dependendo dos sinais neurológicos iniciais (ALMEIDA; DAL PIZZOL; VALLER, 2012): 1: Síndromes lacunares; 2: Síndromes da circulação anterior total; 3: Síndromes da circulação anterior parcial; e 4: Síndromes da circulação posterior.

A classificação utilizada no manejo dos pacientes com AVCI é a do *National Institute of Health Stroke Scale* (NIHSS) que quantifica o déficit neurológico. Nesta classificação, os pacientes são pontuados de zero (sem déficit) a 42 (maior déficit) (BROTT et al., 1989).

1.1 AVCI E RESPOSTA INFLAMATÓRIA

Uma das causas mais frequentes de AVCI é a arteriosclerose, considerada uma doença inflamatória crônica (ROSS, 1999). As lesões isquêmicas cerebrais estão associadas com a indução de uma série de eventos inflamatórios que incluem a infiltração de células imunológicas (neutrófilos, linfócitos, monócitos e macrófagos) e ativação de células residentes (micróglia, astrócitos e células endoteliais). Essas células podem expressar, liberar e responder a mediadores pró-inflamatórios tais como as citocinas (PRENTICE et al., 1982).

Isquemia cerebral e, posteriormente, reperfusão, induzem a uma resposta inflamatória que se inicia na microcirculação das arteríolas pré-capilares, que leva a uma destruição neuronal. Neurônios, astrócitos, micróglia e, principalmente, células endoteliais são ativadas em resposta a isquemia que, por sua vez, liberam citocinas (HALLENBECK, 1996; DEGRABA, 1998). A Zona de Penumbra é o espaço ao redor da área infartada onde existe um sofrimento encefálico reversível, com células sem função, porém viáveis, caracterizando um quadro clínico ainda transitório e, existindo restabelecimento do fluxo sanguíneo cerebral (FSC) em tempo hábil, ocorre normalização funcional e anatômica (ALMEIDA; DAL PIZZOL; VALLER, 2012).

A inflamação é um dos fatores mais importantes na origem do AVCI, especialmente na fase aguda, embora outros fatores estejam envolvidos. Age como o elemento patológico chave da progressão do AVCI. Após a isquemia cerebral ocorre uma robusta reação inflamatória caracterizada pelo influxo de leucócitos periféricos no parênquima cerebral. Se a inflamação é destrutiva ou benéfica pode depender de quão grave a isquemia e em qual estágio da isquemia a resposta inflamatória contribui. O volume do infarto é um dos mais importantes fatores implicados no desfecho funcional em pacientes com AVCI. Vários biomarcadores têm sido associados com o volume final do infarto, alguns desses sendo marcadores moleculares de inflamação. Células com altos níveis de moléculas de adesão intercelular 1 (ICAM-1) e níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, tais como a interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), têm sido encontrados em associação com um maior volume de infarto (CASTELLANOS et al., 2002a).

A reperfusão do vaso ocluído, seja espontânea, por circulação colateral ou recanalização ativa gera espécies de oxigênio reativos (ROS), pelo sangue oxigenado reperfundido ou produzidos entre o cérebro e as células do sistema imunológico. As ROS podem estimular neurônios isquemiados a secretar citocinas e quimiocinas que causam desregulação na adesividade molecular na vasculatura cerebral e recrutamento leucocitário periférico. A infiltração de células inflamatórias periféricas potencializa o dano cerebral. Esses fenômenos são muito observados em reperfusões. O bloqueio da cascata inflamatória parece diminuir o dano cerebral em modelos experimentais de AVCI (HAN; YENARI, 2003).

1.1.1 Células Inflamatórias

Como resposta celular ao AVCI ocorre o acúmulo de células e mediadores inflamatórios no cérebro isquemiado. Após o início da isquemia, células inflamatórias como leucócitos e micróglia são ativadas e causam lesão inflamatória. De quatro a seis horas após o início da isquemia, os leucócitos circulantes aderem à parede vascular, migram e acumulam no tecido cerebral isquêmico com subsequente liberação de mediadores proinflamatórios. Estes mediadores podem causar dano na zona de penumbra.

Geralmente, os neutrófilos são os primeiros subtipos de leucócitos recrutados para o cérebro isquêmico e podem potencializar a lesão diretamente secretando substâncias deletérias ou outros mediadores inflamatórios como as EROs, tais como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxila (OH^{\bullet}) e radical peroxil (LOO^{\bullet}), e as espécies reativas do nitrogênio (ERNs), tais como óxido nítrico (NO) e peroxinitrito ($ONOO^-$) (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2007). A liberação destas substâncias reativas e dos mediadores dos grânulos primários e secundários dos neutrófilos, como proteinases, fosfolipases, elastases e colagenases, têm um importante papel na inflamação e também contribuem para o dano tissular (HALLENBECK, 1996). Leucocitose com neutrofilia é uma alteração laboratorial associada ao AVC e diminuição do número de neutrófilos foi associada com melhora do curso clínico do AVC (WANG et al., 2007).

Leucócitos ativados, especialmente neutrófilos, causam danos nas lesões isquêmicas reperfundidas ou mecanismos de injúria secundária. A contagem de neutrófilos foi considerada um preditor independente de AVCI recorrente (GRAU et al., 2004). Reforçando este resultado, outro estudo demonstrou que a contagem de leucócitos totais e de neutrófilos puderam prever a ocorrência de futuros eventos isquêmicos em uma população Asiática (WU et al., 2013). A elevação dos leucócitos periféricos pode aumentar aterogênese e também refletir na atividade inflamatória da aterosclerose causando lesão vascular e isquemia tecidual (ERNST et al., 1987). Neutrófilos exercem um papel no desenvolvimento e instabilidade da placa aterosclerótica (HUANG et al., 2009), liberam substâncias que induzem vasoconstrição e agregação plaquetária (FRANGOGIANINIS; SMITH; ENTMAN, 2002). Vários estudos comprovam que a inibição leucocitária reduz o dano isquêmico cerebral (HALLENBECK, 1996; DAVIES et al., 1999).

Na isquemia transitória, estudos têm mostrado que o volume do infarto é significativamente reduzido quando o infiltrado de neutrófilos é inibido (BOWES et al., 1995).

Após os neutrófilos, ocorre uma invasão de monócitos/macrófagos que atingem um pico cerca de uma semana após a isquemia (GARCIA; KAMIJYO 1974) e contribuem para a fisiopatologia do estágio subagudo após o AVC. Os monócitos circulantes são importantes fontes de interleucina 8 (IL-8), considerada uma forte quimiocina para neutrófilos. Além disto, os macrófagos derivados de monócitos podem iniciar e amplificar eventos trombogênicos pela expressão do fator tissular nas suas superfícies celulares (EDWARDS; RICKLES; BOBROVE, 1979). Com a liberação de proteinases e a expressão de atividade prócoagulante, os macrófagos contribuem para a ruptura e formação de trombos nas placas de aterosclerose e podem exercer um importante papel no AVC devido à aterosclerose de grandes artérias (GRAU et al., 2004).

A micróglia, macrófago residente do cérebro, exerce papel importante como célula residente imunocompetente e fagocitária do sistema nervoso central (SNC) (KREUTZBERG, 1996) e atua como célula *scavenger* em eventos infecciosos, inflamatórios, traumáticos, isquêmicos e neurodegenerativos (EL KHOURY et al., 1998). Uma vez ativada, a micróglia pode se transformar morfológicamente em fagócito, indistinguível dos macrófagos. A ativação da micróglia pode ser induzida pela isquemia, causando a liberação de substâncias citotóxicas e/ou citoprotetoras (WOOD, 1995). A minociclina parece proteger o cérebro de isquemia pela inibição da ativação e proliferação da micróglia (YRJÄNHEIKKI et al., 1998).

Os astrócitos são considerados à parte das células inflamatórias tradicionais, expressam diferentes tipos de mediadores inflamatórios. Após a isquemia, os astrócitos são ativados e resultam no aumento da expressão da Proteína Ácida Fibrilar Glial (GFAP) e na chamada “gliose reativa”. Estas células são capazes de secretar citocinas, quimiocinas e óxido nítrico sintetase induzida (iNOS). Astrócitos não ativados são importantes para o equilíbrio neuronal; porém, quando ativados podem causar danos (WANG et al., 2007).

Em nível celular, verificou-se que os pacientes submetidos a um evento estressante físico, como AVCI, apresentaram leucocitose, neutrofilia, redução da resposta linfoproliferativa a mitógenos e da atividade fagocítica dos neutrófilos. Em nível molecular, verificou-se elevação dos níveis séricos de cortisol basal, dos

componentes C3 e C4 do sistema complemento, das proteínas de fase aguda, das interleucinas IL-1 e IL-6 e uma mudança no balanço da resposta imunológica mediada pelos linfócitos Th1 e Th2 (REICHE et al., 2004). Os leucócitos estão associados ao maior risco de evento vascular isquêmico, com o risco do primeiro AVCI e com infarto agudo do miocárdio (IAM) (RIDCKER et al., 1997; GRAU et al., 2004).

1.1.2 Moléculas de Adesão Celular

A interação entre leucócitos e o endotélio vascular é mediada por três grupos de moléculas de adesão celular: selectinas, superfamília de imunoglobulinas e integrinas. As selectinas são mediadoras da adesão célula - célula e do rolamento dos leucócitos no endotélio das vênulas pós-capilares. Existem três tipos de selectinas: E-selectina, P-selectina e L-selectina que são expressas na membrana celular externa depois de ativadas por trombina ou histamina. As selectinas P e E parecem envolvidas na resposta inflamatória e dano pós-isquemia. O bloqueio da P-selectina está associado com piora da sobrevida, apesar de reduzir o rolamento dos leucócitos e, conseqüente, a inflamação (RUEHL et al, 2002). Existem diferenças na ação das selectinas nas isquemias focais e nas lesões extensas. O papel da L-selectina parece menos definido.

A superfamília das imunoglobulinas é constituída por moléculas: ICAM-1, moléculas de adesão intercelular 2 (ICAM-2), molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM-1), molécula de adesão celular endotelial plaquetária tipo 1 (PECAM-1) e molécula de adesão celular da adressina da mucosa vascular (MAdCAM-1). Estas moléculas influenciam a adesão entre as células endoteliais e a transmigração leucocitária pelo endotélio. Níveis elevados de ICAM-1 e VCAM-1 foram encontrados em amostras de plasma e líquido cefalorraquidiano (LCR) de pacientes com AVCI recente e estavam relacionados à gravidade do evento. Tentativas de inibição da ICAM-1 com enlimomab não resultaram em melhora clínica dos pacientes (ENLIMOMAB AST, 2001).

As integrinas são formadas por uma subunidade β e uma variável subunidade α . A subunidade β tem três subtipos (1 a 3); o subtipo β 1 liga ao colágeno, laminina e fibronectina e está envolvido na estruturação da matriz celular; o subtipo β -2 está envolvido na adesão celular dos leucócitos e o β -3 incluem as glicoproteínas

plaquetárias IIb/IIIa e o receptor vibronectina, fatores envolvidos na geração e estabilização do coágulo (WANG et al, 2007).

1.1.3 Citocinas

As citocinas estão aumentadas em resposta a vários estímulos tais como isquemia no AVCI e se expressam tanto nas células do sistema imune, como também nas células residentes do cérebro (LIU et al., 1994). As citocinas da imunidade inata, tais como a interleucina 1 β (IL-1 β) e TNF- α são as que iniciam esta resposta inflamatória. Esta ativação é muito precoce, porém transitória. As citocinas têm importante papel no desenvolvimento da reação da fase aguda, tais como febre, leucocitose, elevação das proteínas de fase aguda positivas como proteína C reativa (PCR) e fibrinogênio e na expressão das moléculas de adesão, as quais contribuem para a agregação de leucócitos e posterior adesão na parede vascular (HALLENBECK, 1996; DEGRABA, 1998). As citocinas IL-1 β , interleucina 6 (IL-6), TNF- α , interleucina 10 (IL-10) e fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) são as mais investigadas relacionadas ao AVCI (WANG et al., 2007).

As citocinas próinflamatórias IL-1 α , IL-1 β , IL-6 e TNF- α são produzidas no SNC e, semelhante à periferia, exercem papel pleotrópico funções sobrepostas. As citocinas exercem duas funções por meio de ligações tradicionais nos seus receptores, que são expressos nas células gliais e neuronais (GAHRING et al., 1996) e por mecanismos menos tradicionais como a modulação de receptores neurotransmissores (MILLER et al., 1991; MILLER; FAHEY, 1994). TNF- α aumenta a sobrevivência neuronal do influxo tóxico de cálcio mediado pelo processo de excitotoxicidade, um importante fator para a morte neuronal após o evento isquêmico (CARLSON et al., 1999).

A IL-1 β é produzida no SNC por vários tipos de células e aumento do mRNA de IL-1 β foi observado entre 15-30 minutos após isquemia, o que levou a um aumento da citocina poucas horas depois (DAVIES et al., 1999). IL-1 β promove proliferação e ativação de astrócitos que levam à astrogliose e verificou-se uma correlação entre os níveis de IL-1 β após a isquemia e a gravidade do AVC (JOHN et al., 2004). IL-1 β induz diretamente a expressão de CC quimiocinas (CCL5 ou RANTES) na micrógila e astrócitos (SHICHITA et al., 2012). Coelhos deficientes de IL-1 tiveram menores infartos se comparados às espécies selvagens. A inativação

ou retirada da IL-1 diminui a extensão das lesões hipóxico-isquêmicas. A IL-1 β tende a aumentar em 20 minutos com um novo pico em 6 a 24 h em modelos animais, sendo associada à piora do dano cerebral por isquemia quando administrada em ratos (WANG et al., 2007).

O TNF- α e fator de necrose tumoral beta (TNF- β), também denominado linfotóxina alfa (LTa), são citocinas que desempenham múltiplos papéis na resposta inflamatória e imunomoduladora. TNF- α e TNF- β são conhecidos por induzir uma resposta inflamatória pela ativação do fator nuclear de transcrição *kappa* B (NF- κ B) após a ligação aos receptores de TNF (TNFR1 e TNFR2) que também são expressos em placas ateroscleróticas (BAZZONI; BEUTLER, 1996; NAOUM et al., 2006).

No SNC, o TNF- α é considerado o principal mediador da neuroinflamação que desencadeia uma cascata de eventos celulares e moleculares que culminam com a morte neuronal. A regulação do TNF- α está aumentada no cérebro após isquemia, com aumento inicial em 1-3 horas após o início da isquemia (LIU et al., 1994) e apresenta um padrão de expressão com duas fases com um segundo pico entre 24-36 horas (MURAKAMI et al., 2005; OFFNER et al., 2006). Níveis séricos de TNF- α estão elevados no LCR e no plasma de pacientes que sofreram AVC (VILA et al., 2000) e aumento do TNF- α em pacientes que sofreram o subtipo lacunar de AVCI está associado com deterioração neurológica precoce e pior evolução clínica e incapacidade funcional (CASTELLANOS et al., 2002a).

O papel do TNF- β na inflamação crônica, por sua vez, tem sido sugerido pela sua habilidade de induzir a expressão de ICAM-1 e VCAM-1 nas células endoteliais *in vitro* (POBER et al., 1987; CAVENDER et al., 1989). A expressão de TNF- β resulta em um infiltrado localizado de LT, linfócitos B (LB), células dendríticas foliculares e interdigitais e macrófagos (KRATZ et al., 1996).

Polimorfismos na codificação genética para moléculas proinflamatórias representam importante fator na patogênese e desfecho do AVC. Parreira e colaboradores (2015) sugerem que o genótipo homocigoto para o alelo TNFB2 estava associado a maior expressão dos marcadores inflamatórios e metabólicos de desenvolvimento e prognóstico do que outros genótipos. A identificação deste alelo pode indicar benefícios na terapia anti-inflamatória precoce para o AVC.

A expressão do Fator de Transformação do Crescimento beta 1 (*Transforming Growth Factor beta 1*, TGF- β 1) tem sido relatada em microglia e astrócitos, com níveis baixos nos neurônios. A superexpressão de TGF- β 1 usando um vetor de

adenovírus em cérebros de ratos com AVCI reduziu a resposta inflamatória que acompanha a isquemia (PANG et al., 2001). Estudo recente mostrou que os neurônios cultivados podem ser protegidos de isquemia, pelo TGF- β 1 secretado pelo micróglia. O TGF- β aparece com destaque na fase de recuperação de algumas doenças do SNC, indicando que esta citocina pode contribuir para a recuperação do AVCI (BENVENISTE, 1998).

IL-6 é uma citocina pró-inflamatória com diversas funções biológicas e efeitos deletérios que podem contribuir para a lesão inflamatória inicial no cérebro. IL-6 está envolvida na regulação da apoptose de neurônios e sua regulação é aumentada após a isquemia cerebral (HERRMANN et al., 2003; TUTTOLOMONDO et al., 2012). Estudos clínicos em pacientes com AVC mostraram que a concentração sérica de IL-6 representa valor preditivo independente para mortalidade hospitalar (RALLIDIS et al., 2006).

A IL-6 está fortemente associada à inflamação; no entanto, seu efeito específico na isquemia cerebral ainda está incerto. Demonstrou-se indiferente na isquemia quando avaliada em modelos animais e, em estudo duplo cego em pacientes com AVCI agudo, os tratados com a droga neuroprotetora antagonista do receptor de IL-1 humano recombinante (rhIL-1ra), concentrações menores de IL-6 foram associadas a melhor prognóstico, se comparadas ao placebo (EMSLEY et al., 2005).

Outros estudos também sugerem o papel deletério da IL-6 na isquemia cerebral e o aumento dos níveis plasmáticos de IL-6 é considerado um potente preditor para deterioração neuronal precoce (VILA et al., 2000) e está associado com maior volume da área infartada (CASTILLO et al., 2002a) e com pior prognóstico do paciente (SMITH et al., 2004).

Os pacientes com AVCI lacunar, em geral, apresentam baixos níveis de IL-6. Entretanto, a associação independente entre o risco de piora clínica precoce e aumento de IL-6 foi observada em pacientes com este subtipo de AVCI, assim como os com os outros subtipos CEI, LAAS e UDE (VILA et al., 2000). Vila e colaboradores (2000) encontraram forte correlação entre os níveis de IL-6 e a força da resposta de fase aguda, assim descrita como importante preditor de pior prognóstico em curto prazo. Neste estudo a piora do prognóstico naqueles com aumento precoce dos níveis de IL-6 ocorreu independente da extensão localização e mecanismo inicial do infarto. Kim (1996) demonstrou níveis de IL-6 mais elevados

em pacientes com infartos corticais do que naqueles com lesões subcorticais, incluindo infartos lacunares. Beamer e colaboradores (1998) sugerem que a magnitude da resposta da IL-6 parece ter mais relação com a extensão do que com o mecanismo de lesão do AVCI. Tuttolomondo et al. (2012) também relataram que pacientes com AVCI classificado como CEI apresentaram, comparação com outros subtipos, níveis plasmáticos médios mais elevados de IL-6.

A IL-10 age inibindo a IL-1 e TNF- α e também suprimindo a expressão do receptor da citocina e ativação do receptor. A administração exógena e transferência gênica de IL-10 parecem estar associadas ao melhor prognóstico em isquemia cerebral. A diminuição de IL-10 também foi associada ao pior prognóstico. O aumento da expressão do TGF- β foi associado ao melhor prognóstico e parece estar relacionado aos fatores de recuperação cerebral pós-injúria isquêmica (van EXEL et al, 2002).

1.1.4 Metaloproteinases de Matrix (MMPs)

As MMPs são uma classe de enzimas proteolíticas zinco-dependentes responsável pela degradação das proteínas da matrix extracelular (ECM) e estão envolvidas na remodelação da matriz extracelular assim como na resposta inflamatória. São conhecidas pela habilidade de decompor um ou vários componentes da lâmina basal e da ECM. Entre as múltiplas funções das MMPs, elas estão envolvidas na decomposição dos receptores célula-superfície, ativação ou inativação de quimiocinas e citocinas e na liberação de ligantes apoptóticos. Participam, também, na proliferação, migração, diferenciação angiogênese e apoptose celular (MORANCHO et al, 2010).

Mais de 20 diferentes MMPs têm sido clonadas e caracterizadas em humanos. De acordo com sua estrutura, especificidade de substrato e localização celular, as MMPs podem ser classificadas em vários subgrupos, como gelatinases (MMP-2 e MMP-9), collagenases intersticiais (MMP-1, MMP-9, MMP-3 e MMP-18), estromelisinases (MMP-3 e MMP-10), matrilisina (MMP-7), metaloelastases (MMP-12) e MMPs tipo membrana (MT-MMPs). A expressão das MMPs é regulada transcricionalmente por fatores de crescimento, hormônios, citocinas e transformação celular. A maioria das MMPs, exceto MT-MMPs, é sintetizada com pré-proenzima e secretada de forma inativa na ECM, com subsequente ativação que

resulta na clivagem das proenzimas em espécies ativas. A atividade proteolítica das MMPs é precisamente controlada durante a ativação de seus precursores e modulada pelos inibidores endógenos, α -macroglobulinas e inibidores tissulares das MMPs (TIMPs) (MORANCHO et al., 2010).

A MMP-9, também conhecida como gelatinase B, 92 kDa gelatinase e 92 kDa colagenase tipo IV, representa o maior e mais complexo membro das MMPs. A ativação da proMMP-9 é mediada pelo sistema ativador de plasminogênio/plasmina e outras MMPs. A regulação da atividade da MMP-9 é controlada pelos TIMPs. A MMP-9 é produzida por vários tipos celulares, tais como monócitos, macrófagos, neutrófilos, queratinócitos, fibroblastos, osteoclastos, condrócitos, células endoteliais e várias células tumorais. A expressão da MMP-9 é regulada por várias citocinas e fatores de crescimento, incluindo interleucinas, interferons, TNF- α , *Epidermal Growth Factor* (EGF), *Nerve Growth Factor* (NGF), *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), *Platelet-derived Growth Factor* (PDGF), indutor extracelular de MMPs (EMMPRIN) e osteopontina. Após ativação, a MMP-9 age em um grande espectro de substratos como gelatina, colágeno tipos IV, V, XI e XVI, elastina, decorina, fibrilina, laminina e ativa os fatores de crescimento como TGF- β e proTNF- α . Fisiologicamente, a MMP-9 age de maneira coordenada com as outras MMPs e exerce um papel fundamental no tecido normal remodelando eventos como crescimento neural, desenvolvimento embriônico, angiogênese, ovulação, involução da glândula mamária, cicatrização e formação óssea osteoblástica e/ou inibindo a reabsorção óssea osteoclástica (MORANCHO et al., 2010).

A hipótese padrão é que algumas MMPs exercem papel central na patogênese do AVCI degradando substratos da ECM que são essenciais para a sinalização e homeostase entre as unidades neurovasculares (MORANCHO et al., 2010). MMPs e proteases serinas são fundamentais no dano da ECM ao redor dos vasos sanguíneos cerebrais e neurônios (LIU; ROSBERG, 2005). Elas rapidamente se desregulam após AVCI e edema cerebral e, nestes casos, parecem estar especialmente aumentadas na região do hipocampo (ZHAO et al., 2007). Por outro lado, elas também estariam associadas ao remodelamento na recuperação do AVCI, contribuindo na morfogênese pelas interações célula-célula da ECM e na modulação da liberação de fatores de crescimento celular (ZHAO et al., et al., 2007) e angiogênese (LIU; ROSBERG, 2005).

A participação da MMP-2 e MMP-9 no dano tissular na isquemia cerebral tem sido demonstrada (ROMANIC et al., 1998; MONTANER et al., 2001a; MONTANER et al., 2001b). A MMP-9 estaria associada ao volume do infarto e ao sangramento, ao prognóstico funcional, como indicador de isquemia em curso e transformação hemorrágica relacionada a terapia com ativador de plasminogenio tecidual recombinante (rt-PA) (RAMOS FERNANDES et al., 2011). Níveis elevados de MMP-9 detectados na admissão do paciente indicam AVCI mais extenso e de pior prognóstico mesmo após terapia de revascularização (MORANCHO et al., 2010). Durante a inflamação, o plexo coróide pode ser uma fonte de MMPs encontradas no LCR, secretando MMPs pelo estroma coroidal, o que facilita a migração leucocitária e promove o processo inflamatório pela falência na sua habilidade de limpar os componentes deletérios do cérebro. Esses achados são fortes indicativos da importante participação das MMPs na patogênese do AVCI (COJOCARU et al., 2012).

Ainda é incerto se os efeitos positivos ou negativos dependeriam do tempo em que elas atuam ou do tipo de MMPs em atuação (LUCIVERO et al., 2007). Essas moléculas são responsáveis pela ruptura da barreira hematoencefálica (BHE), levam ao edema vasogênico e contribuem para a transformação hemorrágica do infarto (CASTELLANOS et al., 2002). Durante o AVCI, a BHE é comprometida pelo morte das células endoteliais e conteúdos citosólicos lançados dos tecidos cerebrais injuriados cruzam a BHE. Isso sugere que a mensuração plasmática de proteínas derivadas do cérebro pode servir para monitorar o início e a gravidade do AVCs (COJOCARU et al., 2012). O rompimento da hemostasia celular pode desencadear a morte celular.

O SB-3-CT é um inibidor relativamente seletivo de MMP-9 e reduz o infarto após isquemia focal transitória (ZHAO et al., 2007). Estudos clínicos têm demonstrado a associação entre altos níveis de MMP-9 e o risco de transformação hemorrágica do AVCI, observando concentrações mais elevadas naqueles pacientes em que ocorreu hemorragia (MONTANER et al., 2001b; CASTELLANOS et al., 2003).

A reperfusão cerebral pode causar grave dano tissular, especialmente naqueles pacientes com lesões extensas e de longo tempo de isquemia pré revascularização. A reoxigenação pós-isquemia media a destruição da integridade microvascular seguida pela oclusão. Níveis elevados de MMP-9 pré rtpA são fatores preditores de hemorragia após sua administração (MORANCHO et al., 2010).

Estudos em ratos tratados sem rtPA evidenciaram sua proteção para o AVCI assim como a administração de inibidores do rtPA como neuroserpinas diminuíram o dano cerebral no AVCI (ZHAO et al, 2007). El Ali et al. (2011) encontraram maior ativação de MMP-9 em cérebros isquemiados de ratos hiperlipidêmicos do que nos normolipidêmicos. Lucivero et al (2007) encontraram aumento da MMP-2 após 12 hs do AVCI e da MMP-9 no sétimo dia após o evento isquêmico. Os níveis de MMP-2 aumentaram apenas em infartos lacunares (LAC) enquanto que a MMP-9 nos casos de AVC grave.

Níveis basais de MMP-2 foram encontrados em pacientes que apresentaram melhor recuperação, e os que tinham altos níveis de MMP-9 no sétimo dia após o evento, apresentaram os piores resultados após três meses de evolução. Assim, MMP-2 apareceria primeiro e estaria associada ao melhor prognóstico e MMP-9 apareceria depois e estaria associada ao pior prognóstico (LUCIVERO et al, 2007). Muitos laboratórios pesquisam inibidores seletivos das MMPs que, especificamente, atuem na morte celular e não interfiram nos fatores úteis à regeneração do SNC (LIU; ROSBERG, 2005).

1.1.5 Proteínas de Fase Aguda Positivas

A PCR é uma proteína plasmática sintetizada pelo fígado, marcador inflamatório sistêmico e dinâmico (GABAY; KUSHNER, 1999). Sua concentração pode aumentar em mais de 10.000 vezes durante a resposta inflamatória aguda frente a infecções e danos teciduais graves. Fora desses picos, suas variações com a idade são semelhantes às dos níveis de colesterol e pressão arterial sistólica. Além disso, a quantificação dos níveis séricos de PCR pode ser útil na avaliação do risco vascular. PCR está vinculada à lipoproteína de baixa densidade do colesterol (LDL-C) e está presente nas placas de aterosclerose; desta forma, seus níveis séricos estão associados ao risco coronário (*The Emerging Risk Factors Collaboration Group, 2010*).

O aumento nos níveis séricos de PCR e fibrinogênio também são sinais de inflamação no AVCI e a PCR tem sido considerada como marcador de doença aterotrombótica e pode refletir o nível de atividade inflamatória dentro das placas ateroscleróticas (DANESH et al., 1998; WILSON, 1999; ROST et al., 2001). Os

níveis séricos de PCR são indicadores sensíveis de eventos cerebrovasculares iniciais e recorrentes (ARENILLAS et al., 2003; DI NAPOLI et al., 2005).

Aumento da mortalidade em pacientes que recebem terapia trombolítica também foi associado a níveis elevados de PCR (LANGE et al., 2006; MONTANER et al., 2006). Níveis séricos de PCR determinados por metodologia ultrasensível (usPCR) estão associados com um pior prognóstico após o AVCI e esta associação está mais relacionada à mortalidade e gravidade do AVCI do que sua recorrência. Estudos sugerem uma associação entre determinados polimorfismos do gene da PCR, em que há maior produção de PCR e risco para AVC isquêmico (MORITA; NAKAYAMAN; SOMA, 2006).

Marcadores inflamatórios aumentados como PCR são preditores de AVCI (TUTTOLOMONDO et al., 2010) e o uso da quantificação da usPCR aumentou sua confiabilidade como preditor de risco cardiovascular. Estudos prospectivos com indivíduos aparentemente saudáveis propuseram que, independentemente de outros fatores de risco cardiovascular, níveis plasmáticos aumentados de usPCR são preditores significativos de AIT e AVCI (TUTTOLOMONDO et al., 2010). O significado prognóstico dos níveis séricos de PCR no AIT e AVCI agudo é descrito como de grande valor pois níveis elevados da PCR foram encontrados em pacientes com os piores resultados clínicos pós-AVCI agudo e indicam que o aumento nos níveis séricos desta proteína estaria associado à piora de curto prazo no AVCI (ABUBABAR et al., 2013).

Estudos relatam que altos níveis de PCR estão associados com pior evolução após AVCI e hemorrágico (CASTILLO et al., 2002; CASTELLANOS et al., 2005; EVERETT et al., 2006). Uma coorte de 15.632 mulheres, inicialmente saudáveis, foram monitoradas clínica e laboratorialmente por um período de 10 anos e os resultados demonstraram um risco relativo de 2,76, com intervalo de confiança (IC) de 95%: 1,51-5,05 para um futuro AVCI e sugerem a usPCR como um marcador mais potente de um futuro AVCI quando comparada aos níveis de lipídeos, isoladamente (EVERETT et al., 2006).

Associação entre PCR e enrijecimento da parede arterial foi observada em pessoas saudáveis. Tuttolomondo et al (2013) avaliaram a relação entre rigidez arterial e os níveis plasmáticos de citocinas, selectina, moléculas de adesão e fator de von Willebrand (VWF) em indivíduos com AVCI agudo. O principal achado foi que pacientes com AVCI agudo apresentaram aumento nos marcadores inflamatórios e

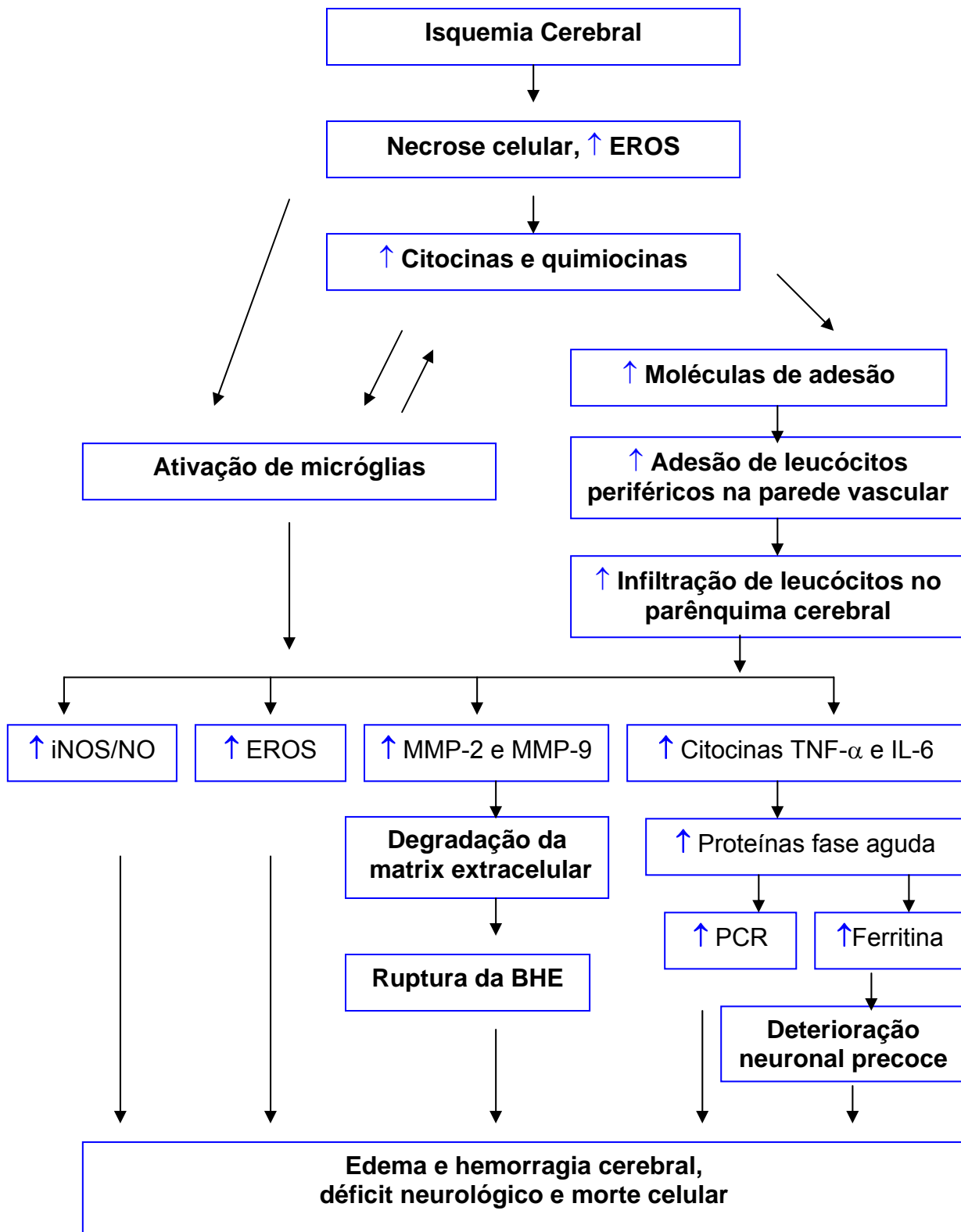
marcadores de enrijecimento arterial quando comparados aos controles sem histórico de AVCI agudo. Este é o primeiro estudo que mostra que nos pacientes com AVCI agudo, alguns níveis de marcadores inflamatórios como PCR, IL-6, IL-1, TNF- α e VWF estão relacionados ao PWV e onda reflexiva (TUTTOLOMONDO et al., 2010).

O endurecimento das grandes artérias hoje é reconhecido como preditor modificável de risco cardiovascular. Di Napoli e colaboradores (2001) avaliaram a influência no prognóstico dos níveis de fibrinogênio e PCR em relação à evolução no primeiro ano pós-AVC em 128 pacientes. Observaram que pacientes com oclusões pré-cerebrais tiveram aumento agudo nos níveis de PCR. Apesar da melhora nos tratamentos para AVCI, permanece alta a ocorrência de novos eventos no ano seguinte ao episódio inicial; por isso, existe a importância de identificar marcadores de risco específicos. O estudo sugeriu que elevados níveis de PCR estão associados a aumento do risco de morte ou de um novo evento no ano seguinte. Existe uma provável associação entre aumento dos níveis séricos de PCR e gravidade da doença aterosclerótica prévia. O aumento da PCR e, de forma menos convincente, do fibrinogênio, foi associado com a piora do prognóstico no AVCI. Os resultados descritos sugerem que o aumento nos níveis de PCR pode ser utilizado como base em novos estudos para refinar a escolha de tratamentos para AVCI (DI NAPOLI et al., 2001).

Outras proteínas de fase aguda positivas avaliadas no AVCI são fibrinogênio e ferritina. O aumento dos níveis de fibrinogênio está associado com o aparecimento de sinais precoces de aterosclerose em indivíduos assintomáticos, sendo considerado importante risco de evento cardiovascular em indivíduos saudáveis e coronariopatas estáveis. O fibrinogênio aumenta após o AVCI e IAM, sendo seus níveis séricos associados ao aumento na mortalidade (DI NAPOLI et al., 2001). Os níveis plasmáticos elevados de ferritina têm sido associados com deterioração neurológica precoce. Valores > 275 mg/mL predizem, independentemente a deterioração neurológica precoce em pacientes com infartos hemisféricos (DAVALOS et al., 2000).

A figura 1 apresenta os principais mecanismos fisiopatológicos da resposta inflamatória após o AVCI.

Figura 1 – Mecanismos inflamatórios envolvidos na fisiopatologia e no prognóstico do acidente vascular cerebral isquêmico agudo



EROS: espécies reativas de oxigênio; iNOS: óxido nítrico sintetase induzida; NO: óxido nítrico; MMP-2: matrix metaloproteinase 2; MMP-9: matrix metaloproteinase 9; TNF α : fator de necrose tumoral alfa; IL-6: interleucina 6, PCR: proteína C reativa; BHE: barreira hematoencefálica; ↑: elevação.
 Fonte: adaptado de Wang et al. (2007).

1.2 ALTERAÇÕES METABÓLICAS E AVCI

Entre os fatores de risco modificáveis importantes para o desenvolvimento e prognóstico do AVCI, estão os que envolvem alterações em diferentes vias do metabolismo, tais como hiperhomocisteinemia, hiperglicemia, resistência à insulina (RI), obesidade e dislipidemia (ROHR et al., 1996, FARACI; LENTZ, 2004; SHINOZAKI et al., 1996; MCILROY et al., 2002; GO et al., 2014).

1.2.1 Hiperhomocisteinemia

Homocisteína é um aminoácido contendo um grupo tiol gerado pela desmetilação intracelular da metionina. A homocisteína é exportada para o plasma e elevação nos seus níveis plasmáticos tem sido associada ao risco cardiovascular e cerebrovascular (MCILROY et al., 2002). A hiperhomocisteinemia produz alterações na parede vascular. Na circulação periférica causa estresse oxidativo, efeitos pró-inflamatórios como a expressão do TNF- α , NO induzido e disfunção endotelial. É considerada como um fator de risco para estenose carotídea, doença de Alzheimer e demência vascular. O estresse oxidativo induzido por hiperhomocisteinemia pode ocorrer pela diminuição da expressão e/ou ativação de enzimas antioxidantes-chaves assim como aumento na formação enzimática de ânion superóxido, precursor para várias EROS e ERNs (MCILROY et al., 2002).

A hiperhomocisteinemia é determinada por vários fatores, incluindo genéticos e dieta. Estudo com alterações genéticas como a deficiência das enzimas cistationina beta-sintetase (CBS), metilenotetrahydrofolato redutase (MTHFR) e metionina sintetase (MS) e dietéticas como metionina, folato e colina, que induzem a hiperhomocisteinemia em ratos, sugerem que: 1) os animais com deficiência de CBS, MTHFR e MS apresentaram disfunções arteriolares cerebrais. A homocisteína (ou algum metabólito próximo, como o S-adenosilhomocisteína), pode ser o mediador que produz disfunção endotelial; 2) menores níveis de homocisteinemia são necessários para causar danos na microcirculação cerebral se comparados aos que lesariam a aorta, um fenômeno de causa ainda desconhecida. Existem evidências clínicas que esse achado valeria também em carótidas humanas; 3) ratos deficientes em CBS evidenciaram que mesmo na hiperhomocisteinemia modesta

ocorre hipertrofia e alterações mecânicas na microcirculação, com provável prejuízo na capacidade de vasodilatação (FARACI; LENTZ, 2004).

A questão principal a ser respondida em estudos futuros seria definir exatamente quais mecanismos contribuem para o aumento aparente da sensibilidade da microcirculação cerebral na hiperhomocisteinemia. Uma meta-análise conduzida pelo *Homocysteine Studies Collaboration* (2002), com resultados de 30 trabalhos prospectivos e retrospectivos obtidos pela busca no MEDLINE por artigos publicados de Janeiro 1966 a Janeiro 1999, onde foram avaliados 5073 eventos isquêmicos cardíacos e 1113 neurológicos em estudos observacionais sobre a associação dos níveis de homocisteína e o risco de doença cardiovascular e AVC, sugere que a hiperhomocisteinemia é, no mínimo, um fator independente (ainda que modesto) de risco para doença isquêmica cardíaca e AVC na população saudável. As associações mais fortes foram observadas em estudos retrospectivos de mensuração de homocisteína em sangue coletado após o início da doença do que em estudos prospectivos entre indivíduos que não tinham história de doença cardiovascular no momento em que o sangue foi coletado. Após o ajuste para saber os fatores de risco cardiovascular e regressão do viés de diluição nos estudos prospectivos, um nível 25% menor que o usual de homocisteína (cerca de 3 $\mu\text{mol/L}$ [0.1 mg/L]). Este nível 25% menor de homocisteína foi associado com 11% de diminuição no risco cardiovascular (OR, 0,89; e intervalo de confiança (IC) de 95% de 0,83-0,96) e 19% no risco de AVCI (OR, 0,81; IC de 95%, 0,69-0,95) (*Homocysteine Studies Collaboration*, 2002). Estudos do impacto no risco de doença isquêmica em variantes genéticas que afetam as concentrações sanguínea de homocisteína poderão ser importantes para determinar a relação da homocisteína com doença vascular, assim como podem grandes séries randomizadas, avaliar a eficiência dos suplementos vitamínicos em abaixar as concentrações de homocisteína sérica, nas doenças isquêmicas cardíacas e cerebrais (*Homocysteine Studies Collaboration*, 2002).

1.2.2 Metabolismo Lipídico e de Carboidratos

Indivíduos com níveis séricos elevados de colesterol total (TC), triglicerídeos, lipoproteína de baixa densidade (LDL-C) e níveis séricos diminuídos da lipoproteína de alta densidade (HDL-C) apresentam maior risco de aterosclerose prematura. Este

fenótipo é multifatorial com a interação de fatores ambientais e diferentes variantes genéticas, como as que codificam as apolipoproteínas, receptores de LDL-C e as enzimas-chaves do metabolismo de lipoproteínas (HASSAN, MARKUS; 2000).

No caso do HDL-C, valores < 40 mg/dL em homens adultos e < 50 mg/dL em mulheres adultas são considerados baixos, sendo um fator de risco para AVC. O nível de triglicérides é considerado elevado quando ≥ 150 mg/dL, sendo também considerado fator de risco para AVC (GO et al, 2014).

Shinozaki e colaboradores (1996) compararam indivíduos com AVCI (subtipados segundo TOAST) e indivíduos saudáveis e observaram que os níveis de triglicérides e apolipoproteína B foram significativamente elevados em pacientes com infarto aterotrombótico. O nível de HDL-C diminuiu acentuadamente naqueles com infarto aterotrombótico comparados com os outros três subtipos de AVCI. Os quatro subtipos de AVCI diferiram quanto não significativa quanto aos níveis de CT e LDL-C.

A RI em associação com a hiperinsulinemia compensatória e dislipidemia também têm sido considerados importantes fatores de risco para o desenvolvimento de ACVI, em especial de infarto aterotrombótico (SHINOZAKI et al., 2006; GO et al., 2014). A RI tem sido considerada o possível elo entre o processo inflamatório e alterações metabólicas, aumentando a chance de desenvolvimento de doenças cardiovasculares (FESTA et al., 2000; DANDONA et al., 2007). Quanto à relação com os subtipos de AVCI, a frequência de diabetes e de hipertensão apareceu igualmente em pacientes com LAC e não-LAC (JACKSON et al., 2010); com estes resultados, os autores sugeriram aos clínicos não se guiarem pela presença ou ausência destes marcadores na avaliação da etiologia do AVCI.

1.3 TRATAMENTO DO AVC

O melhor tratamento para o AVCI ainda é a prevenção, possível por meio da abordagem dos fatores de risco cardiovasculares modificáveis (ALMEIDA; DAL PIZZOL; VALLER, 2012; ROSAMOND et al, 2008). O tratamento depende do tipo de AVC que acomete o indivíduo e pode ser dividido nas fases pré-hospitalar e hospitalar e visa o restabelecimento do fluxo sanguíneo o mais precoce com máxima preservação da zona de penumbra. Isso pode ser feito por meio de cateteres, que removem mecanicamente o coágulo (trombólise mecânica) ou por meio de

medicamentos (trombólise química). O tratamento trombolítico endovenoso é utilizado desde 1995. Antes disso, era utilizado o ácido acetilsalicílico (AAS), que apenas diminui o risco de um novo AVC e, por isso, é tido como um método de prevenção secundária. Cada caso de AVCI deve ser considerado como potencial recebedor de tratamento trombolítico endovenoso, independentemente da região do cérebro afetada. A avaliação da neuroimagem é fundamental no processo, uma vez que a medicação não pode ser utilizada quando há sinais de hemorragia cerebral ou quando a área isquêmica é maior do que um terço da área cerebral média (ABRAMCZUK, VILLELA, 2009).

A Rede Nacional de Atendimento ao AVC, um programa idealizado no fim de 2007 pelo Ministério da Saúde do Brasil, tem como objetivo melhorar a qualidade do atendimento à doença, diminuir o número de pacientes incapacitados e a taxa de mortalidade pelo AVC e diminuir o custo a longo prazo com internações e tratamentos. O projeto prevê a criação de uma rede de assistência ao AVC em todos os níveis de atenção: reconhecimento da população, atendimento pré-hospitalar, hospitalar, reabilitação e prevenção. O programa conta com 45 centros especializados, localizados no Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Espírito Santo, Distrito Federal, Bahia e Amazonas (ABRAMCZUK, VILLELA, 2009).

Para o AVCI, é consenso ser ideal iniciar o tratamento terapêutico em até quatro horas e meia após o início dos sintomas, sendo, por isso, de extrema importância um atendimento emergencial rápido. Adoção e seguimento de protocolos rígidos para conduta nos pacientes em fase aguda do AVCI são fortemente recomendados. O protocolo recomendado pelo grupo de estudos de AVCI do Ministério da Saúde do Brasil (BRASIL, 2013) está nos Anexos 1A e 1B.

2 JUSTIFICATIVA

Os dados descritos na literatura sugerem que as alterações em provas inflamatórias na fase aguda do AVCI podem representar fatores importantes no seu prognóstico. Sabendo que a resposta inflamatória apresenta grande variabilidade individual e que é geneticamente determinada (WATERER; WUNDERINK, 2003), os resultados obtidos em estudos prévios, realizados em populações com diferentes características genéticas, não podem ser generalizados para outras populações, principalmente para a população brasileira, considerada uma das mais geneticamente heterogêneas do mundo (PENA et al., 2011). Além disto, até a presente data não há registros na literatura sobre o papel dos marcadores inflamatórios e metabólicos no desenvolvimento dos diferentes subtipos de AVCI, bem como no déficit neurológico e evolução clínica em pacientes da população sul-brasileira.

Estudos sobre as alterações em provas inflamatórias e metabólicas em pacientes brasileiros que apresentaram AVCI agudo podem confirmar a importância destas alterações nos subtipos e prognóstico do AVCI e contribuir para a utilização de estratégias terapêuticas que levem em consideração estas alterações.

Embora muitos biomarcadores presentes na circulação sanguínea têm sido identificados, eles não estão sendo utilizados na prática clínica, e parte deste desafio está na heterogeneidade da etiologia dos diferentes subtipos de AVCI (JICKLING; SHARP, 2011). Um painel de marcadores laboratoriais poderá ser útil no melhor entendimento da fisiopatologia dos subtipos de AVCI e no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Além disto, a avaliação destes marcadores na admissão hospitalar dos pacientes poderá contribuir para a identificação de pacientes com AVCI agudo que poderiam se beneficiar com terapias individualizadas anti-inflamatórias que modulem as alterações apresentadas.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a resposta inflamatória nos pacientes com AVCI agudo e sua relação com os subtipos de AVCI, deficit neurológico e evolução clínica

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 3.2.1 Descrever as características demográficas, epidemiológicas e clínicas dos pacientes com AVCI agudo, atendidos no HU de Londrina;
- 3.2.2 Avaliar a resposta inflamatória em pacientes com AVCI agudo e em indivíduos saudáveis;
- 3.2.3 Avaliar as alterações metabólicas em pacientes com AVCI agudo e em indivíduos saudáveis;
- 3.2.4 Determinar a associação entre as características demográficas, epidemiológicas, clínicas, inflamatórias e metabólicas com os subtipos de AVCI e grau de déficit neurológico nos pacientes com AVCI agudo;
- 3.2.5 Determinar a associação entre os marcadores metabólicos e inflamatórios obtidos nos pacientes com AVCI agudo com a evolução clínica após três meses do evento isquêmico.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UEL (CAAE 0176.0.268.000-10, Parecer CEP/UEL 181/2010, Anexo 2). Os indivíduos foram convidados a participar voluntariamente da pesquisa e um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) foi obtido dos indivíduos envolvidos na pesquisa ou de seus responsáveis (Anexos 3A e 3B).

4.2 DELINEAMENTO

Foi realizado um estudo observacional, descritivo, prospectivo de prognóstico, com os delineamentos caso-controle para atingir os objetivos 3.2.1, 3.2.2 e 3.2.3 e de seguimento para atingir os objetivos 3.2.4 e 3.2.5.

4.3 POPULAÇÃO

Foram convidados a participar do estudo 235 pacientes com provável diagnóstico de AVCI agudo, adultos, de ambos os sexos, que deram entrada no Pronto Socorro do HU/UEL, em Londrina, Paraná. O convite foi realizado de forma consecutiva, no período de janeiro de 2012 a setembro de 2014. Neste mesmo período, foram convidados indivíduos saudáveis candidatos a doadores de sangue do Hemocentro Regional de Londrina e da população em geral, adultos, de ambos os sexos.

4.4 AMOSTRA

Trata-se de uma amostra consecutiva, de conveniência de tempo e local, com a inclusão, prospectivamente, de 121 pacientes com AVCI agudo, diagnosticados pelo exame clínico e TC de crânio e/ou RNM. O AVCI agudo foi diagnosticado como déficit focal ao exame neurológico, com ou sem distúrbio de consciência; início súbito, agudo ou rapidamente progressivo que persistiu por > 24 horas confirmado por TC de crânio e/ou RNM. Os subtipos de AVCI foram classificados segundo os

critérios definidos pelo *Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment (TOAST)*, publicado em 1993 (ADAMS et al., 1993), que inclui 5 categorias dependendo dos dados clínicos, dos exames laboratoriais e de imagem.

A avaliação do estado de incapacidade funcional foi expresso pelo Índice de Rankin Modificado (mRS) (BONITA, BEAGLEHOLE, 1988) aplicado em até oito horas da admissão no hospital (*baseline*) e após três meses de acompanhamento no Ambulatório de Neurologia do Ambulatório de Especialidades do HU (AEHU) da UEL. Todos os pacientes foram prospectivamente acompanhados por três meses após a alta hospitalar com uma avaliação clínica agendada no AEHU ou uma entrevista por telefone com o paciente ou o mais próximo dele ou responsável (MARINI; TOTORO; CAROLEI, 1999; OH et al., 2011); quando apropriado. Neste momento, foram coletados dados sobre os cuidados médicos recebidos durante o período de seguimento, o estado funcional após o AVCI ou a mortalidade, de acordo com o instrumento descrito no Anexo 4. No caso de óbito, o avaliador solicitava a data do mesmo e se foi em decorrência do AVCI ou por outra causa não relacionada ao evento isquêmico.

O grupo controle foi composto de 96 doadores de sangue saudáveis e fidelizados do Hemocentro Regional de Londrina e da população geral de Londrina, controlados por idade, sexo, etnia e índice de massa corpórea (IMC). Os indivíduos deveriam apresentar não reatividade em todos os testes sorológicos realizados na triagem de doadores de sangue, como anticorpos contra o vírus da imunodeficiência humana tipos 1 e 2 (anti-HIV 1/2), anticorpos contra o vírus da hepatite C (anti-HCV), antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg), anticorpos contra o antígeno *core* do vírus da hepatite B (anti-HBc), anticorpos contra o vírus linfotrópico de células T humanas tipos I e II (anti-HTLV I/II), anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi* e teste não treponêmico para sífilis (VDRL) (BRASIL, 2004).

Foram coletados dados demográficos (idade, sexo e etnia), epidemiológicos como fatores de risco associados ao AVCI (hipertensão, sedentarismo, tabagismo, dislipidemia e diabetes), antropométricos (peso, altura e IMC) e clínicos (pressão sanguínea sistólica e pressão sanguínea diastólica) dos indivíduos inseridos no estudo. Os dados foram coletados pela aplicação de um questionário padrão (Anexo 4), respondidos pelo paciente ou por seus responsáveis e pelo grupo controle. Os dados foram, também, obtidos por meio de consulta aos prontuários médicos e à base de dados LABHOS do Laboratório de Análises Clínicas (LAC) do HU/UEL e do

Hemocentro Regional de Londrina. As medidas antropométricas avaliadas foram peso corporal (kg) e altura (m), obtidas, por interrogatório, durante a aplicação do questionário. O IMC foi calculado como peso (kg) dividido pela altura (m) ao quadrado e expresso em kg/m². Pressão arterial diastólica (PAD) e pressão arterial sistólica (PAS) no período da admissão foram obtidas pelo uso de aparelho digital devidamente calibrado e expressas em mmHg.

4.5 Critérios de Exclusão

Foram excluídos 114 pacientes pelos seguintes critérios: a) recusaram a participar do estudo; b) apresentaram processo inflamatório, autoimune ou infeccioso em tratamento no momento do AVCI, incluindo artrite reumatóide, lúpus eritematosos sistêmico (LES), pneumonia, infecção de trato urinário, infecção pelo HIV-1; c) pacientes em uso crônico de corticosteroides ou imunossupressores; d) portadores de doença renal crônica, hepatopatia crônica, antecedentes de cardiopatias, infecção pelos vírus da Hepatite B, Hepatite C, doença de Chagas, neoplasias, doença de Alzheimer, doença de Parkinson; e) os que apresentaram AIT, AVC hemorrágico, infarto agudo do miocárdio; f) pós-operatório imediato; g) trauma nos últimos 30 dias, e h) pacientes com dados incompletos ou que não tinham amostra biológica para as análises laboratoriais previstas.

4.6 Exames Laboratoriais

Amostras de sangue periférico foram coletadas nas primeiras 24 horas da admissão no hospital pela equipe de funcionários do LAC/HU, segundo a requisição de exames laboratoriais padronizada pelo hospital. Foram coletados 10 mL em tubo de coleta a vácuo sem anticoagulante e dois tubos de 5 mL com anticoagulante EDTA. O material foi encaminhado imediatamente ao laboratório para registro, processamento e armazenamento das amostras. Plasma e soro foram obtidos após centrifugação (10 min 2500 rpm) e armazenados em *freezer* -80 °C até o momento das análises quando as amostras não eram analisadas no mesmo dia. Todos os pacientes e controles e suas respectivas amostras foram identificados por número e letra para garantir o anonimato e confidencialidade dos indivíduos e dos resultados obtidos.

Os exames laboratoriais que fazem parte da rotina no atendimento dos pacientes com AVCI no HU/UDEL foram realizados nos setores de Exames Hematológicos, Bioquímica Clínica e Imunologia Clínica do LAC/HU, utilizando-se de métodos padronizados e reagentes disponíveis comercialmente. Foram considerados os valores de referências estabelecidos pelos fabricantes.

4.6.1 Marcadores Inflamatórios

Os exames de contagem total de leucócitos periféricos (células/mm³), contagem de plaquetas (células/mm³) e velocidade de hemossedimentação (VHS, mm/1^ahora) foram realizados por método automatizado; a dosagem dos níveis plasmáticos de citocinas (IL-1 β , TNF- α e IL-6) foi realizada por método imunoenzimático (ELISA, eBioscience, San Diego, Califórnia, USA), com limite de detecção de TNF- α e IL-6 definido como 2,0 ng/mL e 1,0 ng/mL, respectivamente, de acordo com os fabricantes.

Os níveis séricos de usPCR foram avaliados pelo método automatizado de nefelometria ultrasensível (Nephelometer IITM, Dade Behring, Siemens Healthcare Diagnostics INC., Deerfield, Illinois, USA), com sensibilidade analítica de 0,175 mg/L. Os resultados foram expressos em mg/L e considerados significativos quando maiores que 6 mg/L. Os níveis séricos de ferritina foram avaliados por imunoenensaio de micropartícula com quimioluminescência (ArchitechTM, Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA), expressos em ng/mL; valores > 274,7 ng/mL e > 204,0 ng/mL são considerados elevados para homens e mulheres, respectivamente.

Os níveis de MMP-9 foram avaliados por ELISA tipo sanduíche (Human MMP-9 ELISA kit Invitrogen, CA, USA), expressos em ng/mL e valores entre 22-71 ng/mL foram considerados normais. Valores acima de 71 ng/mL foram considerados elevados. Ambas análises foram realizadas seguindo os protocolos e valores de referência dos fabricantes.

4.6.2 Marcadores Metabólicos

Foram analisados também alguns marcadores metabólicos como níveis séricos de ferro, colesterol total (CT), triglicerídeos (TG), lipoproteína de alta densidade do colesterol (HDL-C), lipoproteína de baixa densidade do colesterol

(LDL-C) e níveis plasmáticos de glicose por método automatizado (Dimension™ Dade AR Dade Behring, Deerfield, IL, USA). Níveis plasmáticos de insulina foram avaliados por imunoensaio de micropartícula com quimioluminescência (Architech™, Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA), expressos em $\mu\text{U/mL}$ e valores maiores que $10,4 \mu\text{U/mL}$ foram considerados significativos.

Os níveis plasmáticos de homocisteína foram avaliados por imunoensaio de micropartícula com quimioluminescência (Architech™, Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA), expressos em $\mu\text{mol/L}$; valores $>16,2 \mu\text{mol/L}$ e $> 13,6 \mu\text{mol/L}$ foram considerados alterados, para homens e mulheres, respectivamente.

O índice de resistência à insulina (IR) foi determinado pelo Modelo de Avaliação da Homeostase (HOMA) para resistência à insulina (HOMA-IR) (HAFFNER; MIETTINEN; STERN, 1997) e foi calculado pelos níveis de insulina em jejum ($\mu\text{U/mL}$) x glicemia em jejum (nmol/L)/22,5. Foi considerado com IR os indivíduos que apresentaram $\text{HOMA-IR} \geq 2,5$.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada utilizando o *GraphPad Prism* versão 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). As variáveis categóricas foram expressas em número absoluto (n) e porcentagem (%) e analisadas pelos testes Qui-quadrado (χ^2) ou Exato de Fisher, quando apropriados. As variáveis contínuas foram expressas como mediana e intervalo interquartil (IQR) 25% -75% e analisadas pelo teste de Mann-Whitney quando as comparações foram entre dois grupos e pelo teste de Kruskal Wallis quando as comparações foram entre mais de dois grupos. Correlações entre as variáveis foram realizadas pelo teste de correlação de Spearman. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

Os resultados obtidos neste trabalho foram apresentados e discutidos em dois artigos científicos.

Artigo 1:

Functional impairment, inflammatory, and metabolic markers of patients with acute ischemic stroke in relation to TOAST subtypes

O artigo foi submetido ao *Metabolic Brain Diseases*, de acordo com as normas para preparação do manuscrito exigido pela revista.

Artigo 2:

Inflammatory and metabolic markers are associated with functional impairment and short-time outcome of patients with acute ischemic stroke

O artigo foi submetido ao *Journal of Neuroinflammation*, de acordo com as normas para preparação do manuscrito exigido pela revista.

ARTIGO 1:**Functional impairment, inflammatory, and metabolic markers in patients with acute ischemic stroke in relation to TOAST subtypes**

Marcio Francisco Lehmann^{a,b}, Ana Paula Kallaur^a, Sayonara Rangel Oliveira^a, Daniela Frizon Alfieri^a, Franciele Delongui^a, Johnathan de Sousa Parreira^a, Maria Caroline Martins de Araújo^c, Carolina Rossato^c, Jéssica Tavares de Almeida^c, Larissa Moliterno Pelegrino^c, Erick Frank Bragato^c, Ana Lucia Cruz Fürstenberger Lehmann^d; Helena Kaminami Morimoto^e, Marcell Alysson Batisti Lozovoy^e, Andrea Name Colado Simão^e, Damácio Ramon Kaimen-Maciel^f, Edna Maria Vissoci Reiche^e

a: Health Sciences Postgraduate Program, Health Sciences Center, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil

b: Department of Clinical Surgery, Health Sciences Center, and Neurosurgery Service of the University Hospital, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil;

c: Medicine Faculty, Health Sciences Center, State University of Londrina, Paraná, Brazil;

d: Neurosciences Institute of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil;

e: Department of Pathology, Clinical Analysis, and Toxicology, Health Sciences Center, State University of Londrina, Paraná, Brazil;

f: Department of Clinical Medicine, Health Sciences Center and Neurology Outpatient of the Outpatient Clinical Hospital, State University of Londrina, Paraná, Brazil;

Address for correspondence: Edna Maria Vissoci Reiche, Department of Pathology, Clinical Analysis and Toxicology, Health Sciences Center, Londrina State University, Av. Robert Koch, 60, CEP 86.038-440, Londrina, Paraná, Brazil. Phone/FAX number: + 55-43-3371-2619. e-mail: reiche@sercomtel.com.br

Running title: Inflammatory and metabolic markers in stroke subtypes

Abstract

The aim of this study was to evaluate the relationship between inflammatory and metabolic markers and acute ischemic stroke subtypes. A total of 121 patients was

classified according to TOAST criteria, such as large artery atherosclerosis (LAAS), lacunar infarct (LAC), cardioembolic infarct (CEI), other determined etiology (ODE), and undetermined etiology (UDE). The functional impairment was evaluated within the first eight hours of stroke and after three-month follow-up using the modified Rankin Scale (mRS). Ninety-six controlled healthy individuals were included. Blood samples were obtained up to 24 hours of stroke to evaluate inflammatory and metabolic markers. Compared with controls, peripheral leukocytes, high-sensitivity (hsCRP), interleukin 6 (IL-6), metalloproteinase 9 (MMP-9), glucose, and iron were higher in LAAS, LAC, and CEI ($p < 0.05$) and high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) were lower in LAAS, LAC, and CEI ($p < 0.0001$); insulin, insulin resistance, and homocystein were higher in LAC ($p < 0.0001$), and total cholesterol (TC) was lower in LAAS and CEI ($p < 0.01$). When stroke subtypes were compared, functional impairment and rate of mortality after follow-up was higher among LAAS than LAC ($p < 0.001$ and $p = 0.0391$ respectively); insulin was higher in LAAS vs. LAC and in LAC vs. CEI ($p < 0.05$); and TC was lower in LAAS vs. LAC ($p < 0.05$). In conclusion, the results underscored the important role of the inflammatory response and some metabolic changes in the pathogenesis of LAAS, LAC, and CEI subtypes that might be considered on the initial evaluation of stroke patients to identify those that could benefit with individualized therapeutic strategies that taken into account these markers after acute ischemic event.

Keywords: inflammation; ischemic stroke; TOAST; C-reactive protein; ferritin; IL-6.

Introduction

Stroke is a complex disorder with interaction between several genetic components and environmental factors. It is defined as a sudden loss of brain function resulting from severe interference in the flow of blood and oxygen in cerebral arteries. Stroke accounted for 10% of deaths per year and is a major cause of long-term adult disability worldwide (Almeida; Dal Pizzol; Valler, 2012). The global distribution of deaths is heterogeneous, with 85% occurring in developing countries, affecting one third of the economically active population (Go et al., 2014). In Brazil, stroke also accounted for 10% of all deaths and for 10% of admissions to public hospitals (Oliveira-Filho et al., 2012; Brazil, 2013). The ischemic stroke subtypes

defined as TOAST criteria (Adams et al., 1993) are large artery atherosclerosis (LAAS), cardioembolic infarct (CEI), lacunar infarct (LAC), stroke of other determined etiology (ODE), and stroke of undetermined etiology (UDE). An involvement of different pathological mechanisms in each stroke subtype has been suggested (Wardlaw et al., 2009). LAC subtype has distinct clinical features and different long-term outcome including risk for recurrence and a different risk factor profile compared with LAAS and CEI subtypes, suggesting that the underlying pathophysiology of LAC is different (Wardlaw et al., 2009).

Acute ischemic stroke may trigger an inflammatory response leading to increased levels of acute phase response markers, such as tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin 6 (IL-6), and C-reactive protein (CRP). Elevated high sensitivity CRP (hsCRP) serum levels have been observed in patients after acute ischemic stroke (Liu et al. 1994; Muir et al., 1999; Canova et al., 1999; Di Napoli et al., 2001; Anuk et al., 2002; Winbecket al., 2002; Emsley et al., 2003; Di Napoli et al., 2005; Murakami et al. 2005; Parreira et al., 2015). CRP levels have been differed between the ischemic stroke subtypes (Rajeshwar et al., 2011) and the largest study evaluating the association of hsCRP with stroke subtypes was carried out in a Swedish population (Ladenvall et al., 2006).

However, there have been discrepancies in the results of different studies evaluating the association of inflammatory markers with stroke subtypes in various ethnic groups (Ladenvall et al., 2006). Licata et al. (2009) showed that patients with CEI subtype presented higher median plasma levels of TNF- α , IL-6, and IL-1 β whereas those with LAC showed lower median plasma levels of TNF- α , IL-6, and IL-1 β , compared with other subtypes. These authors confirmed that CEI subtype has a worse clinical presentation and produces larger and more disabling strokes than other subtypes reporting a possible explanation of higher immune-inflammatory activation of the acute phase response.

Elevated white blood cell and neutrophil counts had similar ability to predict the long-term ischemic stroke events (Wu et al., 2013). However, there was admittedly still no consistent evidence to prove the association of leukocytes with LAC stroke, though atherosclerosis may play a role in LAC stroke (Gan et al., 1997).

Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) expression was increased and related to blood brain barrier (BBB) disruption, edema formation, and some subtypes of hemorrhagic transformation after CEI stroke (Rosenberg et al., 1998; Castellanos et

al., 2002; Montaner et al., 2003; Morancho et al., 2010; Montaner et al., 2001). Serum concentration of MMP-9 has been correlated with the onset of cerebral vasospasm and predicts hemorrhagic transformation in patients with acute ischemic stroke (Vukasovic et al., 2006). Positive correlation was recorded between plasma MMP-9 levels and neurological deficit at baseline, 12, 24, and 48 h after stroke (Demir et al., 2012) and these levels increased after stroke onset correlating with infarct volume, stroke severity, and functional outcome (Ramos-Fernandez et al., 2011). However, the results of MMP-9 levels in patients with different stroke subtypes are conflicting (Lucivero et al., 2007; Kreisel et al., 2012).

The extent variability in genes coding for proteins of pathways involved in the inflammation (Waterer; Wunderink, 2003), considered the main pathophysiologic pathway of ischemic stroke, limits the generalization of previous results to the Brazilian population, considered one of the most genetically heterogeneous worldwide, as result of a great miscegenation (Pena et al. 2011; Brazil, 2013). Previous study showed that white blood cells, IL-6, hsCRP, and ESR were positively correlated with the neurological deficit in a cohort of Brazilian patients (Parreira et al., 2015).

Differences in inflammatory and metabolic parameters in patients with acute ischemic stroke subtypes are reported with conflicting findings (Tirschwell et al., 2004; Di Napoli et al., 2005; Rigal et al., 2007; Licata et al., 2009). To the best of our knowledge, no studies have investigated these associations in acute ischemic stroke patients from Brazilian population. To address this issue, this study aimed to evaluate the relationship between clinical, inflammatory and metabolic markers and the acute ischemic stroke subtypes of Brazilian patients.

Material and Methods

Design

First, a case-control study was carried out with ischemic stroke patients and healthy individuals to evaluate the association between functional impairment, inflammatory, and metabolic markers and the ischemic stroke. Further, a cross-sectional study was conducted to evaluate the relationship between these markers with different stroke subtypes. The study was approved by the Ethics Committee on Research Involving Human Subjects at the State University of Londrina, Londrina,

Southern Brazil (Document CEP/UEL 294/2011). All individuals invited were informed in detail about the investigation and voluntarily signed the Informed Consent Form.

Study subjects

Two hundred and thirty-five patients hospitalized at the Emergency Room of the University Hospital of State University of Londrina, Southern Brazil, were prospectively enrolled from January 2012 to September 2014. Of them, 121 patients met the inclusion criteria and were attended for first-ever acute ischemic stroke, diagnosed with focal neurological signs or symptoms thought to be of vascular origin that persisted for > 24h, confirmed by brain computed tomography (CT) and clinic examination in baseline conditions. The stroke subtypes were classified according to the TOAST criteria (Adams et al. 1993). The functional impairment was evaluated using the modified Rankin Scale (mRS) (Bonita and Beaglehole, 1988) applied within the first eight hours of admission (baseline) and three-month followed up. The outcome was assessed by clinical examination or using telephone interviews with the patients or their relatives (Oh et al., 2011). The patients were divided in two groups: mRS < 3 was graded as favorable outcome or independence (no symptoms/mild disability) and ≥ 3 was graded as unfavorable outcome or dependence (moderate/severe disability) (Abubakar et al., 2013; Uyttemboogart et al., 2014). The outcome was defined as mortality after three-month follow up of the patients with acute ischemic stroke. All the patients were managed using a standardized protocol adapted from international guidelines for managing acute ischemic stroke (Brazil, 2013).

The exclusion of 114 patients was made according to these criteria: haemorrhagic stroke; acute transient ischemic attack (AIT); chronic infectious and inflammatory conditions, such as human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1), hepatitis B and C infections, rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus, and inflammatory bowel disease; renal or liver failure; acute inflammatory diseases, such as pneumonia and urinary tract infection; recent history of fever within last seven days prior to onset of stroke symptoms; history of myocardial infarction, surgery within last 30 days, angiography within last seven days, trauma within last 30 days, malignancies, steroid or non-steroidal anti-inflammatory therapies and immunosuppressive drugs use; incomplete data.

Ninety-six age, ethnicity, and body mass index (BMI) controlled healthy individuals from the Blood Bank of Londrina and from general population of Londrina were enrolled in the same period, with similar demographic and anthropometric characteristics. The same exclusion criteria were applied as for the stroke patients.

Demographic, epidemiological, anthropometric, and clinical data with recording of traditional stroke risk factors and the use of any therapeutic drugs before the inclusion in the study were obtained using a standard questionnaire on admission. The anthropometric measures were body weight and height reported by the individuals, when it was possible, or by the patient's family. BMI was calculated as weight (kg) divided by height (m) squared. The ethnicity was self-reported as Caucasian and non-Caucasian (Afro-Brazilian, and Asiatic) (Brazil, 2013). Three baseline blood pressure evaluations were obtained using digital apparatus properly calibrated, and the mean of these measurements was used in the analysis. Systolic blood pressure (SBP) ≥ 130 mmHg and diastolic blood pressure (DBP) ≥ 85 mmHg or the use of antihypertensive was an indication of hypertension (Pickering et al. 2005).

Blood samples

Peripheral blood samples were collected within the 24 hours of the admission at the hospital with and without EDTA as anticoagulant. The plasma and serum samples were immediately separated by centrifugation (2,500 rpm for 15 min) and stored in aliquots at freezer -80 °C when the analysis were not assayed in the same day of the sample collection.

Inflammatory and metabolic markers

White blood cell counts (cells/mm³), platelet counts (cells/mm³), and erythrocyte sedimentation rate (ESR) (mm/1stst hour) were determined using hematological autoanalyzers. Serum hsCRP was determined using nephelometry (NephelometerII™, Dade Behring-Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Deerfield, Illinois, USA), with analytical sensitivity of 0.175mg/L. Plasma TNF- α and IL-6 levels were evaluated using a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA, eBioscience, San Diego, California, USA). Ferritin was determined using chemiluminescence microparticle immunoassay (Architech™, Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA); serum levels of MMP-9 were evaluated using a sandwich ELISA (Human MMP-9 ELISA kit Invitrogen, CA, USA). The non-fasting serum total

cholesterol (TC), triglycerides (TG), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), iron, and plasma glucose and were determined using a biochemical autoanalyzer (Dimension™ Dade AR Dade Behring, Deerfield, IL, USA). Plasma insulin and homocysteine levels were determined using chemiluminescence microparticle immunoassay (Architech™, Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA). All the laboratory analysis were performed according to the manufacturer's instructions and their reference values.

The homeostasis model assessment (HOMA) was used as a surrogate measurement of insulin resistance (IR) (Haffner; Miettinen; Stern, 1997). HOMA-IR was calculated using the insulin fasting ($\mu\text{U}/\text{mL}$) x glucose fasting (nmol/L)/22.5. It was considered IR when subjects exhibited $\text{HOMA-IR} \geq 2.5$.

Statistical analysis

The statistical analysis was performed using GraphPad Prism version 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Categorical variables were expressed in absolute number (n) and percentage (%) and were analyzed using Chi-square test or Fisher Exact test, when appropriate, with Yates' correction. Continuous variables were expressed as median and interquartile range (IQR) 25%-75% and analyzed using the Mann-Whitney test. To compare continuous variables from more than two groups, Kruskal-Wallis test was used, with Dunn's post-test. Spearman's rank correlation test was performed to investigate the relationship between inflammatory markers and mRS obtained at baseline and after three-month follow-up. Odds ratio (OR) and 95% confidence interval (95% CI) were also determined. All the results were considered significant when $p < 0.05$.

Results

The stroke cases comprised of 68 (56.2%) men and 53 (43.8%) women (ratio male/female 1.3:1) while the controls were 23 men (24.0%) and 73 women (76.0%). According to TOAST classification, 35 (28.9%) were classified as LAAS, 21 (17.3%) as CEI, 39 (32.2%) as LAC, eight (6.6%) as ODE, and 18 (14.9%) as UDE. The most common modifiable risk factors for stroke were hypertension in 87 (71.2%), sedentarism in 68 (56.2%), dyslipidemia in 45 (37.2%), diabetes in 45 (37.2%), smoking in 26 (21.5%), alcohol use in 14 (11.6%), and acute myocardial infarction in nine (8.0%).

Demographic, anthropometric, and clinical, characteristics associated with acute ischemic stroke, according to stroke subtypes of 95 patients are shown in Table 1. The patients classified as ODE and UDE were not included in the statistical analysis of the association between the variables and stroke subtypes. Compared with controls, the frequency of men was higher among those with LAAS, LAC, and CEI ($p < 0.0001$, $p = 0.0016$, and $p = 0.0016$, respectively) and Non Caucasians were more frequent among those with LAAS ($p = 0.0039$). When the subtypes of stroke were compared each other, Caucasians were more frequent among those with LAC ($p = 0.0045$) and the functional impairment (mRS) on admission was higher among those with LAAS than those with LAC [6.0 (4.0-5.0) vs 4.0 (3.0-4.0), respectively, $p < 0.001$]. The patients with LAAS presented a worse clinical outcome, with higher rate of mortality than those with LAC (45.7% vs 20.5%, $p = 0.0391$, OR 0.3.263 (95%CI: 1.173-9.078). However, the rate of mortality did not differ when either LAAS vs CEI were compared [$p = 0.1757$, OR 2.695 (95%CI: 0.8078-8.989)] or LAC vs CEI were compared [$p = 0.9738$, OR 0.8258 (95%CI: 0.2319-2.941)].

Inflammatory markers associated with stroke subtypes are shown in Table 2. Independently of the subtype, the patients presented higher peripheral leukocyte counts, hsCRP, IL-6, and MMP-9 than controls ($p < 0.05$). Compared with controls, those patients with LAC presented higher platelet count ($p < 0.05$), and those with LAAS presented higher levels of ferritin ($p < 0.0001$). When the inflammatory markers were compared between the subtypes, no significant difference was obtained ($p > 0.05$).

Metabolic markers associated with acute ischemic stroke subtypes are shown in Table 3. Independently of the stroke subtype, the patients presented higher levels of glucose ($p < 0.0001$) and lower levels of HDL-C ($p < 0.0001$) and iron than controls ($p < 0.01$). Compared with controls, those with LAC presented higher levels of insulin ($p < 0.0001$), HOMA-IR ($p < 0.0001$), and homocystein ($p < 0.001$) than other subtypes; moreover, patients with LAAS and CEI presented lower levels of TC ($p < 0.01$ and $p < 0.0001$, respectively). When the metabolic markers were analysed between the subtypes, patients with LAC showed higher levels of insulin than those with LAAS ($p < 0.05$) and with CEI ($p < 0.05$) and patients with LAC showed higher levels of TC than those with CEI ($p < 0.05$). However, IL-6, hsCRP, and MMP-9 serum levels did not differ when the stroke subtypes were compared ($p > 0.05$).

Discussion

To the best of our knowledge, this is the first study to evaluate the association of functional impairment, inflammatory, and metabolic markers with the acute ischemic stroke subtypes in Brazilian population. Some epidemiological and blood-based biomarkers represent potential tools to determine the cause of stroke and a number of biomarkers have been associated with stroke subtypes. This distinction is clinically important because treatment and diagnostic testing are different between the subtypes (Jickling et al., 2010).

LAC was the most common subtype observed in this study, suggesting the presence of uncontrolled hypertension and diabetes. This finding is lower than the previously reported (Syed et al., 2003; Aquil et al., 2011) and higher than those obtained in other populations (Kaul et al., 2002; Liu et al., 2006; Osmani et al., 2010). The frequency of LAAS was lower compared with one study (Syed et al., 2003) but comparable with other (Aquil et al., 2011). The frequency of CEI was higher than previous findings (Kaul et al., 2002; Syed et al., 2003; Aquil et al., 2011) and some of these discrepancies may be due to ethnic differences between the evaluated populations.

Male was more frequent among all the patients with acute ischemic stroke of the present study, independently of the subtype, and this result is consistent with previous reports (Tuttolomondo et al., 2010; Katsiki et al., 2011; Townsend et al., 2012). Other studies also did not find differences in stroke subtypes according to sex (Barret et al., 2007; Petrea et al., 2009) while one showed that women tend to have more CEI stroke and sub-arachnoid hemorrhage whereas men are more likely to suffer from small embolic or LAC stroke or intracerebral hemorrhage (Wardlaw et al., 2009). These authors obtained the higher frequency of women among those with LAC than with cortical stroke. The most common modifiable risk factors for stroke in the present cohort were hypertension, sedentary lifestyle, dyslipidemia, diabetes, smoking, alcohol use, and acute myocardial infarction, as reported previously (Kelly et al., 2008; Lawes et al., 2008; Aquil et al., 2011). Hypertension is the most important risk factor for stroke, contributing, approximately, to 50.0% of all the ischemic strokes (Lawes et al., 2008).

The higher frequency of non Caucasians than Caucasians among patients with LAAS is consistent with previous study (Tirschwell et al., 2004). The BMI did not

differ among the stroke patients, although an association between BMI and incidence of ischemic stroke in men but not in women from the Japanese community was reported (Yonemoto et al., 2011).

Our results of the higher degree of acute neurological deficit on admission observed among the patients with LAAS compared with LAC and CEI and the higher rate of mortality among those with LAAS compared with LAC, with an odds of 3.263, varying from 1.173 to 9.078 to death in the short-time follow up, are consistent with previous study (Tuttolomondo et al., 2010). These authors reported that LAAS is related with more extent infarction, such as carotid occlusions and the middle cerebral artery that are associated with poor outcome. However, the present results were different from Licata et al. (2009) who showed that patients classified as CEI subtype had a high degree of neurological deficit on admission. The differences obtained in the neurological deficit evaluations may be explained by the fact that Licata et al. (2009) used the Scandinavian Stroke Scale (SSS) to assess the acute neurological deficit of the patients that evaluated different functional parameters. Moreover, the subjectivity of self-reported dependency could be influenced by personal circumstances, such as socioeconomic status and psychological factors (Uytenboogaart et al., 2014).

Compared with controls, all the acute ischemic stroke patients evaluated in the present study, independently of the subtype, presented higher levels of peripheral leukocytes, hsCRP, IL-6, and MMP-9, and glucose. Moreover, all the patients presented lower levels of iron and HDL-C, with the lowest levels of this lipid marker observed among those with LAAS. These findings underscore the important role of the inflammatory and metabolic profile in the pathogenesis of all the ischemic stroke subtypes (Licata et al., 2009; Vila et al., 2000; Wu et al., 2013). These results are desirable to determine their significance considering the potential therapeutic implications and may provide a potential opportunity for interventions aimed at improving outcome.

Although the presence of dyslipidemia was found among 37.2% of patients of the present study, the serum levels of TC, TG, and LDL-C did not differ compared with the controls. This result could be explained, in part, by different environmental factors (diet, lifestyle) and preanalytical variables, such as nonfasting blood collection and the use hypolipemiant drugs before the stroke by the patients. When the lipid markers were compared with different stroke subtypes, TC was the unique that

differed between groups of TOAST classification. However, the higher levels of TC presented by patients with LAC than CEI, but similar with LAAS, contrasted with other studies that showed the highest values of TC and LDL-C in patients with LAAS (Rigal et al., 2007; Tirschwell et al., 2004).

In the present cohort of patients, significant differences of some markers were observed in a specific stroke subtype, such as the presence of increased ferritin in LAAS, whereas high platelet counts, and increased insulin, HOMA-IR, and homocystein in LAC. These results are consistent with previous study showing the involvement of different pathological mechanisms in each stroke subtype (Wardlaw et al., 2009). LAC subtype has distinct clinical features and different long-term outcome including risk for recurrence and a different risk factor profile compared with LAAS and CEI subtypes, suggesting that the underlying pathophysiology of LAC is different (Wardlaw et al., 2009). Tanizaki et al (2000) showed that LAC had a greater variety of risk factors, including not only hypertension but also electrocardiography abnormalities, diabetes, obesity, and smoking that did LAAS and CEI.

In the present study, LAAS was associated with high levels of ferritin than controls and worse mRS than other subtypes on admission. This result is consistent with findings that plasma ferritin levels > 275 ng/mL independently predict early neurological deterioration in patients with hemisphere infarcts (Dávalos et al., 2000).

The inflammatory markers were not associated with stroke subtypes in the present study; however, they had the ability to predict the worse short-time outcome of the patients, in accordance with previous study (Wu et al. 2013). There was admittedly still no consistent evidence to prove the association of leukocytes with LAC, though atherosclerosis may play a role in LAC subtype (Gan et al., 1997).

Moreover, patients with CEI subtype showed higher plasma levels of IL-6 and hsCRP whereas those patients with LAC subtype showed higher levels of insulin than LAAS and higher total cholesterol than CEI subtypes. Although no statistically difference was obtained for IL-6 and hsCRP markers, probably because the limited number of individuals enrolled in the study, this finding was consistent with previous findings (Chaudhuri et al., 2013) revealing that the prevalence of high hsCRP levels was highest in patients with CEI (83.3%), followed by LAAS (72.0%).

TNF- α is considered the principal mediators of neuroinflammation that elicits a cascade of cellular events culminating in neuronal death. In the present study, TNF- α did not differ when the patients and controls were compared, as well as between the

stroke subtypes. In contrast, IL-6 levels were consistently higher among the patients than controls, independently of the stroke subtype, but did not differ regarding the stroke subtype. This finding was quite unexpected, as positive correlations with infarct size have been found for proinflammatory cytokines including TNF- α and IL-6. It could be hypothesized that serum TNF- α levels probably reflect more the response to the body to the ischemic insult than the extent of ischemic damage (Intiso et al., 2003). TNF- α is rapidly expressed in ischemic brain tissue within 1-3 h after ischemia onset (Liu et al. 1994), and has a two-phase pattern of expression with a second peak at 24-36h and the upregulation of the TNF receptors is observed thereafter (Murakami et al. 2005). Another possible explanation for this contrasting result is that the different locations of the infarcts may not influence the TNF- α expression. Therefore, the current results show that the TNF- α levels are not an appropriate indicator of ischemic stroke subtypes. In contrast with

Different from our results, previous study reported that CEI was associated with higher median plasma levels of TNF- α , IL-6, and IL-1 β whereas LAC was associated with lower median plasma levels of TNF- α , IL-6, and IL-1 β , compared with other subtypes (Licata et al., 2009). These authors also reported that patients with CEI subtype and with high plasma levels of the IL-6 presented a poor clinical presentation (high mRS scores) and those with LAC subtype and with low plasma levels of cytokines presented showed a better clinical presentation (low mRS scores).

The present study underscored the role of MMP-9 in the pathophysiology of ischemic stroke as previously reported (Ramos-Fernandez et al., 2011; Demir et al., 2012; Cojocararu et al., 2012); however, it is conflicting with other (Lucivero et al., 2007) that demonstrated higher MMP-9 levels only in patients with a more severe stroke subtype classified as partial anterior cerebral infarct (PACI) compared with healthy subjects.

The restricted number of patients with different stroke subtypes could be the main limitation of this study that was particularly seen in several inflammatory markers, as they did not distinguish between the different stroke subtypes. However, the rigorous exclusion criteria that limited the sample may contribute to the validity of the results. Other limitation could be the single-point measurement of the inflammatory and metabolic markers since repeated measures should be necessary to define the variance for our findings, as well as predictive nature of a biomarker.

However, in support for our findings, several studies previously reported the usefulness of single-point measurement of inflammatory biomarkers in several clinical conditions including atrial fibrillation, congestive heart failure, and acute myocardial infarction (Jorgensen et al., 1996; Chin et al., 2003; Conway et al., 2004) as well as similar number of individuals (Di Napoli et al., 2001). In further support of our single-point evaluation, other study reported that two markers of inflammation and one marker of thrombosis are highly correlated with stroke at six and 24 h and that the extended time evolution of TNF- α response in humans, peaking at 2-3 days sustains our choice to evaluate biomarker plasma levels within 72 h of symptom onset (Lynch et al., 2004).

The association of high hsCRP, IL-6, and MMP-9 with different stroke subtypes in different populations may be secondary to unknown interactions between several polymorphisms of *CRP*, *IL6*, and *MMP9* genes and environmental factors in stroke patients (Cvetkovic et al., 2005; Morita et al., 2006; den Hertog et al., 2010; Manso et al., 2010; Manso et al., 2011; Munshi et al., 2011; Cui et al., 2012) and the Brazilian population heterogeneity could be another cause for the lack of significant results in the inflammatory markers according to the stroke subtype.

The use of biomarkers has made a strong impact in understanding the pathophysiology of stroke and the approach to its treatment (Whiteley et al., 2012). The only approved pharmacological therapy for acute stroke is thrombolysis, which acts mediating recanalization and often induces secondary hemorrhage depending on the infarct size. The identification of clinical biomarkers of acute cerebral ischemia would facilitate the use of time-sensitive reperfusion strategies offering a potential role for improved treatment selection and individualization of therapy (Kisialiou et al., 2012)

Taken together, this study showed that LAAS presented higher levels of disability and mortality than other stroke subtypes, changes in glucose metabolism was associated with LAC subtype, and the IL-6 levels were increased in all the stroke subtypes. These results underscored that all stroke subtypes were associated with an increased innate immune-inflammatory response, such as leukocyte counts, hsCRP, IL-6, and MMP-9, and low levels of HDL-C. Additionally, the results suggest that some modifiable risk factors, such as diabetes, hyperferritinemia, hyperinsulinemia as well as insulin resistance, and hyperhomocysteinemia may be correlated with different stroke subtypes and could further help in the clinical practice

for the acute ischemic stroke management reducing complications following acute treatment. Further studies are necessary with a large number of patients of each stroke subtype to confirm the predictive role of the inflammatory and metabolic biomarkers, evaluating also longer time intervals.

Acknowledgments

The study was supported by Institutional Program for Scientific Initiation Scholarship (PIBIC) of the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq); State University of Londrina (PROPPG); and Bayer HealthCare. We thank the University Hospital of State University of Londrina and HUTec Foundation for technical and administrative supports.

Conflict of interest statement

All the authors declare there is no conflict of interest.

References

Abubakar AS, Okubadejo NU, Ojo OO et al (2013) Relationship between admission serum C-protein and short-term outcome following acute ischemic stroke at a tertiary health institution in Nigeria. *Nigerian Journal of Clinical Practice* 16: 320-324.

Adams HP Jr, Bendixen BH, Kappelle JJ et al (1993) Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions of use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke* 24: 35-41.

Almeida AGd, Dal Pizzol A, Valler L. Acidente Vascular Isquêmico Agudo: Fatores de Risco. In: Nasi LA (Org). *Rotinas em Unidade Vascular*. Porto Alegre: Artmed, 2012.

Anuk T, Assayag EB, Rotstein R et al (2002) Prognostic implications of admission inflammatory profile in acute ischemic neurological events. *Acta Neurol Scand* 106:196-199.

Aquil N, Begum I, Ahmed A, et al (2011) Risk factors in various subtypes of ischemic stroke according to TOAST criteria. *J Coll Physicians Surg Pak* 21:280-283.

Barrett KM, Brott TG, Brown RD Jr et al (2007) Frankel MR, Worrall BB, Silliman SL, Case LD, Rich SS, Meschia JF; Ischemic Stroke Genetics Study Group. Sex differences in stroke severity, symptoms, and deficits after first-ever ischemic stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 16:34-39.

Bonita R, Beaglehole R (1988) Modification of Rankin Scale: Recovery of motor function after stroke. *Stroke* 19:1497-1500.

Bowes MP, Rothlein R, Fagan SC, Zivin JA. Monoclonal antibodies preventing leukocyte activation reduce experimental neurologic injury and enhance efficacy of thrombolytic therapy. *Neurology* 1995; 45:815-819.

Brazil. Manual de Rotinas para atendimento ao AVC. Editora Ministério da Saúde. Brasília; Ministério da Saúde; 2013.

Brazil. IBGE. *Brazilian Institute of Geography and Statistics. (2011) Characteristics of the Population and Households: Results of the Universe.* Available in: http://www.ibge.gov.br/english/estatistica/populacao/censo2010/caracteristicas_da_populacao/default_caracteristicas_da_populacao.shtm. Accessed in July 16, 2013.

Brazil. Ministry of Health. System of Mortality Information (SIM) and IBGE. [Internet] [accessed 2013 Dec 01]. Available from: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2011/c08.def>.

Canova CR, Courtin C, Reinhart WH (1999) C-reactive protein (CRP) in cerebrovascular events. *Atherosclerosis* 147:49-53.

Castellanos M, Leira R, Tejada J et al (2002) Predictors of good outcome in medium to large spontaneous supratentorial intracerebral haemorrhages. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 76: 691-695.

Chaudhuri JR, Mridula KR, Umamahesh M, Swathi A, Balaraju B, Bandaru VC (2013) High sensitivity C-reactive protein levels in acute ischemic stroke and subtypes: A study from a tertiary care center. *Iran J Neurol* 12:92-97.

Chin BS, Blann AD, Gibbs CR, Chung NA, Conway DG, Lip GY (2003) Prognostic value of interleukin-6, plasma viscosity, fibrinogen, von Willebrand factor, tissue factor and vascular endothelial growth factor levels in congestive heart failure. *Eur J Clin Invest* 33:941-948.

Cojocarui IM, Cojocarui M, Sapira V, Socoliuc G, Herteau C, Paveliu S (2012) Changes in plasma matrix metalloproteinase-9 levels in patients with acute ischemic stroke. *Rom J Intern Med* 50:155-158.

Conway DS, Buggins P, Hughes E, Lip GY (2004) Prognostic significance of raised plasma levels of interleukin-6 and C-reactive protein in atrial fibrillation. *Am Heart J* 148:462-466.

Cvetkovic JT, Wiklund PG, Ahmed E, Weinehall L, Hallmans G, Lefvert AK (2005) Polymorphisms of IL-1beta, IL-1Ra, and TNF-alpha genes: a nested case-control study of their association with risk of stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 14: 29-35.

Dávalos A, Castillo J, Marrugat J et al (2000) Body iron stores and early neurologic deterioration in acute cerebral infarction. *Neurology* 54:1568-1574.

Demir R, Ulvi H, Özel L, Özdemir G, Güzelcik M, Aygül R (2012) Relationship between plasma metalloproteinase-9 levels and volume and severity of infarct in patients with acute ischemic stroke. *Acta Neurol Belg* 112:351-356.

Di Napoli M, Schwaninger M, Cappelli R et al (2005) Evaluation of C-reactive protein measurement for assessing the risk and prognosis in ischemic stroke: a statement for health care professionals from the CRP Pooling Project members. *Stroke* 36:1316–1329.

Di Napoli M, Papa F, Bocola V (2001) C-reactive protein in ischemic stroke: an independent prognostic factor. *Stroke* 32:917-924.

Emsley HC, Smith CJ, Gavin CM et al (2003) An early and sustained peripheral inflammatory response in acute ischaemic stroke: relationships with infection and atherosclerosis. *J Neuroimmunol* 139:93-101.

Gan R, Sacco RL, Kargman DE, Roberts JK, Boden-Albala B, Gu Q (1997) Testing the validity of the lacunar hypothesis: the Northern Manhattan Stroke Study Experience. *Neurology* 48:1204-1211.

Go AS, Mozaffarian D, Roger VL et al (2014) Heart Disease and Stroke Statistics - 2014 Update: A Report from the American Heart Association. *Circulation* 129:e28-e292.

Haffner SM, Miettinen H, Stern MP (1997) The homeostasis model in San Antonio Heart Study. *Diabetes Care* 20:1087-1092.

Intiso D, Zarrelli MM, Lagioia G et al (2004) Tumor necrosis factor alpha serum levels and inflammatory response in acute ischemic stroke patients. *Neurol Sci* 24:390-396.

Jickling GC, Xu H, Stamova B et al (2010) Signatures of cardioembolic and large-vessel ischemic stroke. *Ann Neurol* 68:681-692.

Jørgensen HS, Nakayama H, Reith J, Raaschou HO, Olsen TS (1996) Acute stroke with atrial fibrillation. The Copenhagen Stroke Study. *Stroke* 27:1765-1769.

Katsiki N, Ntaios G, Vemmos K (2011) Stroke, obesity and gender: a review of the literature. *Maturitas* 69:239-243.

Kaul S, Sunitha P, Suvarna A, Meena AK, Uma M, Reddy JM (2002) Subtypes of Ischemic Stroke in a Metropolitan City of South India (One year data from a hospital based stroke registry). *Neurol India* 50 Suppl:S8-S14.

Kelly PJ, Morrow JD, Ning M et al (2008) Oxidative stress and matrix metalloproteinase-9 in acute ischemic stroke: The biomarker evaluation for antioxidant therapies in stroke (BEAT-Stroke) Study. *Stroke* 39:100-104.

Kisialiou A, Pelone G, Carrizzo A et al (2012) Blood biomarkers in acute ischemic stroke patients: higher is worse or better? *Immun Ageing* 9:22.

Kreisel SH, Stroick M, Reuter B, Senn E, Hennerici MG, Fatar M (2012) MMP-2 concentrations in stroke according to etiology: adjusting for enzyme degradation in stored deep-frozen serum and other methodological pitfalls. *J Clin Neurosci* 19:1564-1567.

Ladenvall C, Jood K, Blomstrand C, Nilsson S, Jern C, Ladenvall P (2006) Serum C-reactive protein concentration and genotypes in relation to ischemic stroke subtype. *Stroke* 37:2018-2023.

Lawes CM, Vander Hoorn S, Rodgers A, International Society of Hypertension (2008). Global burden of blood pressure-related disease, 2001. *Lancet* 371:1513-1518.

Licata G, Tuttolomondo A, Di Raimondo D, Corrao S, Di Sciacca, Pinto A (2009) Immuno-inflammatory activation in acute cardio-embolic strokes in comparison with other subtypes of ischemic stroke. *Tromb Haemost* 101:929-937.

Liu T, Clark RK, McDonnell PC, Young PR, White RF, Barone FC, Feuerstein GZ. Tumor necrosis factor-alpha expression in ischemic neurons. *Stroke* 1994; 25: 1481-1488.

Liu X, Xu G, Wu W, Zhang R, Yin Q, Zhu W (2006) Subtypes and one-year survival of first-ever stroke in Chinese patients: The Nanjing Stroke Registry. *Cerebrovasc Dis* 22:130-136.

Lucivero V, Prontera M, Mezzapesa DM et al (2007) Different roles of matrix metalloproteinases -2 and -9 after human ischemic stroke. *Neurol Sci* 28: 165-170.

Lynch JR, Blessing R, White WD, Grocott HP, Newman MF, Laskowitz DT (2004) Novel diagnostic test for acute stroke. *Stroke* 35:57-63.

Manso H, Krug T, Sobral J et al (2011) Variants in the inflammatory IL6 and MPO genes modulate stroke susceptibility through main effects and gene-gene interactions. *J Cereb Blood Flow Metabol* 31:1751-1759.

Manso H, Krug T, Sobral J et al (2010) Variants of the Matrix Metalloproteinase-2 but not the Matrix Metalloproteinase-9 genes significantly influence functional outcome after stroke. *BMC Med Genet* 11:40.

Montaner J, Alvarez-Sabín J et al (2001) Matrix metalloproteinase expression is related to hemorrhagic transformation after stroke. *Stroke* 32:2762-2767.

Montaner J, Rovira A, Molina CA et al (2003) Plasmatic level of neuroinflammatory markers predict the extent of diffusion-weighted image lesions in hyperacute stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 23:1403-1407.

Morancho A, Rosell A, García-Bonilla L, Montaner J (2010) Metalloproteinase and stroke infarct size: role for anti-inflammatory treatment? *Ann N Y Acad Sci* 1207:123-133.

Morita A, Nakayama T, Soma M (2006) Association between C-reactive protein genes and ischemic stroke in Japanese subjects. *Am J Hypertens* 19:593-600.

Muir KW, Weir CJ, Alwan W, Squire IB, Lees KR (1999) C-reactive protein and outcome after ischemic stroke. *Stroke* 30:981-985.

Murakami Y, Saito K, Hara A et al (2005) Increases in tumor necrosis factor- α following transient global cerebral ischemia do not contribute to neuron death in mouse hippocampus. *J Neurochem* 93: 1616-1622.

Oh MS, Yu KH, Chu MK et al (2011) Long-term prognosis of symptomatic isolated middle cerebral artery disease in Korean stroke patients. *BMC Neurology* 11:138.

Oliveira-Filho J, Martins SC, Pontes-Neto OM et al (2012) Guidelines for acute ischemic stroke treatment: part I. *Arq Neuro-Psiquiatr* 70: 621-629.

Osmani AH, Durrani RK, Ara J (2010) Comparison of outcome in different types of stroke due to cerebral ischemia. *Coll Physicians Surg Pak* 20:42-46.

Parreira JS, Kallaur AP, Lehmann MF et al (2015) Tumor necrosis factor β polymorphism (rs909252) is associated with inflammatory and metabolic markers in acute ischemic stroke. *Metab Brain Dis* 30:159-167.

Pena SD, Di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M et al (2011) The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PLoS One* 6: e17063.

Petrea RE, Beiser AS, Seshadri S, Kelly-Hayes M, Kase CS, Wolf PA (2009) Gender differences in stroke incidence and poststroke disability in the Framingham heart study. *Stroke* 40:1032-1037.

Pickering TG, Hall JE, Appel LJ et al (2005) Recommendation for blood pressure measurement in humans and experimental animals. Part 1: blood pressure measurement in humans: a statement for professionals from the Subcommittee of Professional and Public Education of the American Heart Association Council on High Blood Pressure Research. *Hypertension* 45:142-161.

Rajeshwar K, Kaul S, Al-Hazzani A et al (2012) C-reactive protein and nitric oxide levels in ischemic stroke and its subtypes: correlation with clinical outcome. *Inflammation* 35:978-984.

Ramos-Fernandez M, Bellolio MF, Stead LG (2011) Matrix metalloproteinase-9 as a marker for acute ischemic stroke: a systematic review. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 20:47-54.

Rigal M, Ruidavets JB, Viguier A et al (2007) Lipoprotein (a) and risk of ischemic stroke in young adults. *Neurol Sci* 252:39-44.

Rosenberg GA, Estrada EY, Dencoff JE (1998) Matrix metalloproteinases and TIMPs are associated with blood-brain barrier opening after reperfusion in rat brain. *Stroke* 29: 2189-2195.

Syed NA, Khealani BA, Ali S et al (2003) Ischemic stroke subtypes in Pakistan: the Aga Khan University Stroke Data Bank. *J Pak Med Assoc* 53:584-588.

Tanizaki Y, Kiyohara Y, Kato I, Iwamoto H, Makayama K, Shinohara N, et al (2000) Incidence and risk factors for subtypes of cerebral infarction in a general population. *Stroke* 31:2616-2622.

Tirschwell DL, Smith NL, Heckbert SR, Lemaitre RN, Longstreth WT Jr, Psaty BM (2004) Association of cholesterol with stroke risk varies in stroke subtypes and patient subgroups. *Neurology* 63:1868-1875.

Tuttolomondo A, Raimondo DD, Pecoraro R et al (2010) Immune-inflammatory markers and arterial stiffness indexes in subjects with acute ischemic stroke. *Atherosclerosis* 213:311-318.

Uyttenboogaart M, Stewart RE, Vroomen PC, De Keyser J, Luijckx GJ (2005) Optimizing cutoff scores for the Barthel index and the modified Rankin scale for defining outcome in acute stroke trials. *Stroke* 6:1984-1987.

Vila N, Castillho J, Dávalos A, Chamorro Á (2000) Proinflammatory cytokines and early neurological worsening in ischemic stroke. *Stroke* 31:2325-2329.

Vukasovic I, Tesija-Kuna A, Topic E, Supanc V, Demarin V, Petrovic M (2006) Matrix metalloproteinases and their inhibitors in different acute stroke subtypes. *Clin Chem Lab Med* 44:428-434.

Wardlaw JM, Doubal F, Armitage P et al (2009) Lacunar stroke is associated with diffuse blood-brain barrier dysfunction. *Ann Neurol* 65:194-202.

Waterer GW, Wunderink RG (2003) Science review: Genetic variability in the systematic inflammatory response. *Critical Care* 7:308-314.

Whiteley W, Wardlaw J, Dennis M et al (2012) The use of blood biomarkers to predict poor outcome after acute transient ischemic attack or ischemic stroke. *Stroke* 43:86-91.

Winbeck K, Poppert H, Etgen T, Conrad B, Sander D (2002) Prognostic relevance of early serial C-reactive protein measurements after first ischemic stroke. *Stroke* 33:2459-2464.

Wu TH, Chien KL, Lin HJ et al (2013) Total white blood cell count or neutrophil count predict ischemic stroke events among adult Taiwanese: report from a community-based cohort study. *BMC Neurol* 13:7.

Yonemoto K, Doi Y, Hata J et al (2011) Body mass index and stroke incidence in a Japanese community: the Hisayama study. *Hypertens Res* 34:274-279.

Table 1 – Demographic, anthropometric, and clinical characteristics associated with acute ischemic stroke subtypes among the patients from Brazilian population

	Controls (n=96)	Ischemic stroke patients (n=95)			p value		
		LAAS (n=35)	LAC (n=39)	CEI (n=21)	LAAS vs control	LAC vs control	CEI vs control
Sex (Male/Female)	23/73 (24.0-76.0)	22/13 (62.9/37.1)	21/18 (53.8/46.2)	13/8 (61.9/38.1)	<0.0001	0.0016	0.0016
Ethnicity					0.0039	NS	NS
Caucasian	80 (83.3)	20 (57.1)	34 (87.2)	14 (66.7)			
Non Caucasian	16 (16.7)	15 (42.9)*	5 (18.2)	7 (33.4)			
Age (years)	69.0 (62.5-75.2)	68.5 (63.5-74.0)	73.0 (61.0-78.0)	70.5 (60.0-79.3)	NS	NS	NS
BMI (Kg/m ²)	26.9 (23.8-29.8)	28.1 (23.5-30.3)	24.9 (22.04-27.3)	24.6 (21.8-31.0)	NS	NS	NS
modified Rankin Scale	-	5.0 (4.0-5.0)**	4.0 (3.0-4.0)	4.0 (3.0-5.0)	-	-	-
Outcome after three-month follow-up							
Survival	-	19 (54.3)	31 (79.5)	16 (76.2)	-	-	-
Death	-	16 (45.7)***	8 (20.5)	5 (23.8)	-	-	-

Categorical variables are expressed as number (n) and were analysed with Chi-Square test or Fisher exact Test ($p < 0.05$) with Yates's correction.

Continuous variables are expressed median (interquartile range 25%-75%) and were analysed using Kruskal-Wallis test with Dunn's post-test.

LAAS: Large Artery Atherosclerosis Stroke; LAC: Lacunar infarct; CEI: Cardio-Embolic Infarct; BMI: body mass index; NS: not significant

Other 26 patients classified as stroke with other determined etiology (ODE, n=) and as undetermined etiology (UDE, n=) were not included in the statistical analysis. *Ethnicity: LAAS vs LAC: $p=0.0045$; ** Modified Rankin scale: LAAS vs LAC: $p < 0.001$; ***Mortality: LAAS vs. LAC: $p=0.0391$, OR 3.263 (95%CI: 1.173-9.078); LAAS vs. CEI: $p=0.1757$, OR 2.695 (95%CI: 0.8078-8.989); LAC vs. CEI: $p=0.9738$, OR 0.8258 (95%CI: 0.2319-2.941).

Table 2 – Inflammatory markers associated with acute ischemic stroke subtypes among patients from Brazilian population

	Controls (n=96)	Ischemic stroke patients (n=95)			p value		
		LAAS (n=35)	LAC (n=39)	CEI (n=21)	LAAS vs control	LAC vs control	CEI vs control
Leukocyte (cells/mm ³)	7320 (5490-5546)	10000 (7290-11720)	8860 (6419-9990)	9800 (7713-20200)	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Platelets (x10 ⁵ cells/mm ³)	227.5 (191.5-267.0)	210.0 (188.0-255.3)	241.0 (189.9-286.8)	216.5 (169.0-260.7)	NS	<0.05	NS
ESR (mm)	11.0 (6.0-17.0)	13.0 (6.0-23.0)	15.0 (7.5-22.0)	12.0 (4.3-22.3)	NS	NS	NS
hsCRP (mg/L)	2.37 (1.10-5.21)	7.55 (2.3-39.7)	4.55 (2.1-18.0)	12.4 (3.10-55.8)	<0.0001	<0.0001	<0.0001
TNF- α (pg/mL)	2.0 (2.0-6.85)	2.0 (2.0-3.39)	2.25 (2.0-5.27)	2.0 (2.0-5.03)	NS	NS	NS
IL-6 (pg/mL)	1.05 (1.00-3.18)	13.01 (4.86-38.29)	9.15 (5.48-22.12)	27.39 (7.97-46.98)	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Ferritin (ng/mL)	100.0 (60.6-116.5)	260.8 (163.4-357.2)	118.6 (76.1-301.9)	235.0 (90.7-333.4)	<0.0001	NS	NS
MMP-9 (ng/mL)	686.4 (544.8-1048.0)	1137.0 (809.0-1813.0)	1367.0 (763.5-1775.0)	1307.0 (814.5-1750.0)	<0.01	<0.01	<0.05

Continuous variables are expressed median (interquartile range 25%-75%) and were analysed using Kruskal-Wallis test with Dunn's post-test.

LAAS: Large Artery Atherosclerosis Stroke; LAC: Lacunar infarct; CEI: Cardio-Embolic Infarct; ESR: erythrocyte sedimentation rate; hsCRP high sensitivity C-reactive protein; TNF- α : tumor necrosis factor alpha; IL-6: interleukin 6; MMP-9: matrix metalloproteinase 9; NS: not significant

Table 3 – Metabolic markers associated with the acute ischemic stroke subtypes among patients from Brazilian population

	Controls (n=96)	Ischemic stroke patients (n=95)			p value		
		LAAS (n=35)	LAC (n=39)	CEI (n=21)	LAAS vs control	LAC vs control	CEI vs control
Glucose (mg/dL)	93.0 (84.0-105.5)	121.0 (101.5-192.5)	121.0 (107.5-170.5)	131.0 (99.0-173.0)	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Insulin (µU/mL)	9.3 (3.5-12.5)	12.5* (7.1-16.5)	18.9* (8.7-41.6)	8.7 (5.7-19.5)	NS	<0.0001	NS
HOMA-IR	2.3 (1.5-3.1)	4.2 (2.3-7.0)	36.10** (28.5-71.6)	3.4 (2.1-7.1)	NS	<0.0001	NS
Total cholesterol (mg/dL)	202.5 (167.3-222.0)	162.0 (137.0-207.5)	175.5 *** (152.5-204.3)	143.0 (122.0-173.0)	<0.01	NS	<0.0001
Triglyceride (mg/dL)	132.5 (98.0-175.5)	118.0 (59.8-150.0)	124.5 (88.0-178.0)	81.0 (63.0-130.0)	NS	NS	NS
LDL-C (mg/dL)	115.4 (83.6-140.8)	98.0 (74.0-134.8)	102.2 (84.4-131.6)	83.0 (72.4-116.6)	NS	NS	NS
HDL-C (mg/dL)	53.5 (44.0-61.7)	37.0 (32.0-44.3)	39.0 (31.0-51.5)	37.0 (32.0-46.0)	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Homocystein (µmol/L)	11.4 (9.9-13.9)	13,5 (9.0-17.0)	15.0 (12.4-17.5)	15.3 a (11.6-18.6)	NS	<0.0001	NS
Iron (µg/dL)	100.0 (80.8-116.5)	65.5 (57.0-100.8)	70.5 (52.0-108.3)	45.0 (29.0-81.0)	<0.01	<0.01	<0.0001

Continuous variables are expressed median (interquartile range 25%-75%) and were analysed using Kruskal-Wallis test with Dunn's post-test.

LAAS: Large Artery Atherosclerosis Stroke; LAC: Lacunar infarct; CEI: Cardio-Embolic Infarct; HOMA-IR: homeostasis model assessment for insulin resistance; LDL-C: low-density lipoprotein cholesterol; HDL-C: high-density lipoprotein cholesterol; NS: not significant; *Insulin: LAAS vs. LAC: p<0.05; LAC vs. CEI: p<0.05; ** HOMA-IR: LAAS vs. LAC: p<0.0001; LAAS vs. CEI: NS; LAC vs. CEI: p<0.0001; *** Total Cholesterol: LAC vs. CEI p<0.05

ARTIGO 2

Inflammatory markers are associated with functional impairment and short-time outcome in patients with acute ischemic stroke

Marcio Francisco Lehmann^{a,b}, Ana Paula Kallaur^a, Sayonara Rangel Oliveira^a, Daniela Frizon Alfieri^a, Franciele Delongui^a, Johnathan de Sousa Parreira^a, Maria Caroline Martins de Araújo^c, Carolina Rossato^c, Jéssica Tavares de Almeida^c, Larissa Moliterno Pelegrino^c, Erick Frank Bragato^c, Helena Kaminami Morimoto^d, Marcell Alysson Batisti Losovoy^d, Andrea Name Colado Simão^d, Damacio Ramón Kaimen-Maciel^e, Edna Maria Vissoci Reiche^d

a: Health Sciences Postgraduate Program, Health Sciences Center, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil

b: Department of Clinical Surgery, Health Sciences Center, and Neurosurgery Service of the University Hospital, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil;

c: Medicine Faculty, Health Sciences Center, State University of Londrina, Paraná, Brazil;

d: Department of Pathology, Clinical Analysis, and Toxicology, Health Sciences Center, State University of Londrina, Paraná, Brazil;

e: Department of Clinical Medicine, Health Sciences Center and Neurology Outpatient of the Outpatient Clinical Hospital, State University of Londrina, Paraná, Brazil;

Address for correspondence: Edna Maria Vissoci Reiche, Department of Pathology, Clinical Analysis and Toxicology, Health Sciences Center, Londrina State University, Av. Robert Koch, 60, CEP 86.038-440, Londrina, Paraná, Brazil. Phone/FAX number: + 55-43-3371-2619. e-mail: reiche@sercomtel.com.br

Abstract

Background: The aim of this study was to evaluate the association between inflammatory markers with the functional impairment, and short-time outcome of patients with acute ischemic stroke. T

Methods: The study included 121 patients and 96 age, ethnicity, and body mass index (BMI) controlled healthy individuals. The subtype of stroke was classified using TOAST criteria and the functional impairment of the patients up to eight hours of stroke and after three-month follow-up was evaluated using the modified Rankin Scale (mRS). Blood samples were obtained up to 24 hours of stroke to evaluate peripheral leukocyte and platelet counts, erythrocyte sedimentation rate (ESR), serum levels of interleukin 6 (IL-6), tumor necrosis factor alpha (TNF- α), high sensitivity C-reactive protein (hsCRP), ferritin, and matrix metalloproteinase 9 (MMP-9).

Results: Stroke patients comprised of 68 (56.2%) men and 53 (43.8%) women. Compared with controls, patients with mild disability presented higher peripheral leukocytes ($p < 0.0001$), IL-6, and MMP-9 ($p < 0.05$) and those with moderate/severe disability showed higher peripheral leukocytes, hsCRP, ferritin, MMP-9 ($p < 0.0001$), ESR, and IL-6 ($p < 0.05$). When the patients were compared according to their neurological deficit, those with moderate/severe disability presented higher ESR, hsCRP, and IL-6 ($p < 0.05$) than those with mild disability. Positive correlation was observed between mRS with peripheral leukocytes ($r = 0.2588$, $p = 0.0061$), ESR ($r = 0.3832$, $p = 0.0002$), usCRP ($r = 0.3777$, $p < 0.0001$), and IL-6 ($r = 0.3332$, $p = 0.0011$) evaluated on admission of the patients. Moreover, ESR, hsCRP, IL-6, and MMP-9 presented positive correlation with the difference between mRS on admission and after three-month follow-up ($r = 0.2758$, $p = 0.03298$; 0.2491 , $p = 0.0207$; $r = 0.3549$, $p = 0.0007$; and $r = 0.2554$, $p = 0.0342$, respectively). An association was observed between mRS, peripheral leukocytes, hsCRP, IL-6, and MMP-9 on admission with the rate of mortality after three-month follow-up, with higher levels of these markers among the non-survivors than the survivors ($p < 0.0001$, $p = 0.0117$, $p = 0.0074$, $p < 0.0001$, and $p = 0.0435$, respectively).

Conclusion: The results underscored the extent inflammatory response associated with acute ischemic stroke, exerting an important role in the pathogenesis and outcome. These markers may be useful in the initial evaluation of stroke patients to

determine their magnitude considering the potential therapeutic implications aimed at improving the outcome of these patients.

Keywords: ischemic stroke, disability, inflammation, IL-6, C-reactive protein, matrix metalloproteinases, modified Rankin Scale

Introduction

Stroke is a complex disorder with interaction between several environmental and genetic factors and it is defined as a sudden loss of brain function resulting from severe interference in the flow of blood and oxygen in cerebral arteries. Stroke accounted for 10% of deaths per year and is a major cause of long-term adult disability worldwide [1]. In Brazil, stroke also accounted for 10% of all deaths and for 10% of admissions in public hospitals [2,3].

Conventional risk factors, such as hypertension, atherosclerosis, atrial fibrillation, smoking, diabetes, body mass index (BMI), and age account for a significant proportion of stroke risk [4]. In addition, several physiological pathways related to inflammatory response, lipid metabolism, endothelial dysfunction, hypercoagulability, hyperhomocysteinemia, and insulin resistance have been implicated in the pathophysiology of stroke and these biomarkers were evaluated in different populations [4-9].

Acute ischemic stroke may trigger an inflammatory response and the levels of acute phase response markers have been investigated in different populations [10-22]; some of these markers were associated with recurrent ischemic stroke [23,24]. White blood cell counts, mainly neutrophils, are increased after an ischemic event [25]; tumor necrosis factor alpha (TNF- α) is considered the principal mediator of neuroinflammation that elicits a cascade of cellular events culminating in neuronal death [26,27]. Other cytokine that plays a pivotal role in the pathogenesis of stroke is interleukin 6 (IL-6) which can damage the endothelium and lead to the initiation of atherosclerosis; and it is also related to ischemic neural damage and clinical worsening [28]. Between the acute phase proteins, C-reactive protein (CRP) has been assessed in the early phase of stroke as a prognostic factor for functional outcome [16, 29, 30]. There is evidence that hsCRP predicts mortality after stroke [10, 29].

The expression of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) was increased and related to blood-brain-barrier (BBB) disruption, edema formation, and some subtypes of hemorrhagic transformation after cardioembolic infarct [31, 32-35]. Serum concentration of MMP-9 was correlated with the onset of cerebral vasospasm and was found to predict hemorrhagic transformation in patients with acute ischemic stroke [36]. MMP-9 levels were significantly increased after stroke onset and correlated with infarct volume, stroke severity, and functional outcome [37] and a positive correlation was also obtained between MMP-9 levels and neurological deficit at baseline, 12, 24, and 48 h after stroke [38].

However, there have been discrepancies in the results evaluating the association of inflammatory markers, mainly CRP levels, with stroke in various ethnic groups [39]. Some studies have found an association between increased CRP levels and clinical outcome between 12 and 72 h after ischemic stroke [12, 13] whereas others did not find an association between CRP levels evaluated within 6 or 12 h after symptoms onset and death or disability at follow-up [16, 30]. The extent variability in the genes coding for the molecules of the pathways involved in the inflammatory response [40], considered the main pathophysiologic pathway of ischemic stroke, limits the generalization of these previous results to the Brazilian population, considered one of the most genetically heterogeneous worldwide, as result of a great miscegenation [41, 42].

To the best of our knowledge, no studies have investigated association between inflammatory markers in acute ischemic stroke patients from Brazilian population so far. Therefore, the aim of the present study was to evaluate the inflammatory markers in early phase of ischemic stroke and to determine the relationship between these markers and the functional neurological impairment on admission and the outcome, including death at three-month follow-up post-ischemic event.

Material and Methods

Design

A case-control study was carried out with stroke patients and healthy individuals to evaluate the association between inflammatory markers and the ischemic stroke. Further, a cross-sectional study was conducted to evaluate the

relationship between these markers with functional impairment on admission and short-time outcome of the patients. The study was approved by the Ethics Committee on Research Involving Human Subjects at the State University of Londrina, Londrina, Southern Brazil. All the invited individuals were informed in detail about the investigation and voluntarily signed the Informed Consent Form.

Study subjects

The study included 235 patients hospitalized at the Emergency Room of the University Hospital of State University of Londrina prospectively enrolled from January 2012 to September 2014. Of them, 121 patients were attended for first-ever acute ischemic stroke, diagnosed with focal neurological signs or symptoms thought to be of vascular origin that persisted for > 24h, confirmed by brain computed tomography (CT) and clinic examination in baseline conditions. The subtype of acute ischemic stroke was classified according to the TOAST criteria [43]. The functional impairment score was evaluated using the modified Rankin Scale (mRS) [44] applied within eight hours of the admission (baseline) and three-month followed up after stroke. The follow-up outcome was assessed by clinical examination or using telephone interviews with the patients or their relatives [45]. At baseline, the patients were divided in two groups: mRS < 3, graded as mild disability, favorable outcome or independence and mRS ≥ 3, graded as moderate/severe disability, unfavorable outcome or dependence. The mRS was graded as 6 with the death of the patient after three-month follow-up related with the occurrence of the previous ischemic event [21,46]. The outcome was defined as mortality after three-month follow up of the patients with acute ischemic stroke. All the patients were managed using a standardized protocol adapted from international guidelines for managing acute ischemic stroke [47].

The study excluded 114 patients according to these criteria: haemorrhagic stroke; acute transient ischemic attack (AIT); chronic infectious conditions, such as human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1), hepatitis B and C infections; renal or liver failure; inflammatory chronic diseases, such as rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus; acute inflammatory diseases, such as pneumonia and urinary tract infection; recent history of fever within last seven days prior to onset of symptoms of stroke; history of myocardial infarction, surgery within last 30 days, angiography within last seven days, malignancies, steroid or non-steroidal anti-

inflammatory therapies and immunosuppressive drugs use; trauma within last 30 days; and incomplete data.

Ninety-six age, ethnicity, and body mass index (BMI) controlled healthy individuals from the Blood Bank and general population of Londrina were enrolled in the same period, with similar demographic and anthropometric characteristics, and from the same geographic area. The same exclusion criteria were applied as for stroke patients.

Demographic, epidemiological, anthropometric, and clinical data with recording of potential traditional stroke risk factors and the use of any therapeutic drugs before the inclusion in this study were obtained using a standard questionnaire on admission. Anthropometric measures were body weight and height reported by the individuals, when it was possible, or by the patient's family. BMI was calculated as weight (kg) divided by height (m) squared. The ethnicity was self-reported as Caucasoid and non-Caucasoid (Afro-Brazilian and Asiatic) [42]. Three baseline blood pressure evaluations were obtained using digital apparatus properly calibrated, and the mean of these measurements was used in the analysis. Systolic blood pressure (SBP) ≥ 130 mmHg and diastolic blood pressure (DBP) ≥ 85 mmHg or the use of antihypertensive was an indication of hypertension [48].

Blood samples

Peripheral blood samples were collected within the 24 hours of the admission at the hospital with and without EDTA as anticoagulant. The plasma and serum samples were immediately separated by centrifugation (2,500 rpm for 15 min) and stored in aliquots at freezer -80 °C when the analysis were not assayed in the same day of the sample collection.

Inflammatory markers

White blood cell counts (cells/mm³), platelet counts (cells/mm³), and erythrocyte sedimentation rate (ESR) (mm/1st hour) were determined using hematological autoanalyzers. Serum high sensitivity C-reactive protein (hsCRP) was determined using nephelometry (NephelometerII™, Dade Behring-Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Deerfield, Illinois, USA), with analytical sensitivity of 0.175 mg/L. TNF- α and IL-6 plasma levels were evaluated using a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA, eBioscience, San Diego, California,

USA). Serum ferritin levels were determined using chemiluminescence microparticle immunoassay (Architech™, Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA) and serum MMP-9 levels were evaluated using a sandwich ELISA (Human MMP-9 ELISA kit Invitrogen, CA, USA). All the laboratory analysis were performed according to the manufacturer's instructions and reference values.

Statistical analysis

The statistical analysis was performed using GraphPad Prism version 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Categorical variables were expressed in absolute number (n) and percentage (%) and were analyzed using Chi-square test (with Yates's correction) or Fisher Exact test, when appropriate. Continuous variables were expressed as median and interquartile range (IQR) 25%-75% and analyzed using the Mann-Whitney test. To compare continuous variables from more than two groups, Kruskal-Wallis test was used, with Dunn's post-test. The Spearman's rank correlation test was performed to investigate the relationship between inflammatory markers and mRS obtained at baseline and after three-month follow-up. Odds ratio (OR) and 95% confidence interval (95% CI) were also determined. All the results were considered significant when $p < 0.05$.

Results

Demographic and anthropometric characteristics of acute ischemic stroke patients obtained on admission were evaluated according to the baseline mRS (Table 2). The stroke patients comprised of 68 (56.2%) men and 53 (43.8%) women (ratio male/female 1.3:1) while the controls were 23 men (24.0%) and 73 women (76.0%), with significant difference in sex distribution of cases and controls ($p > 0.05$). Compared with controls, patients with both mild disability and moderate/severe disability were more frequent among men ($p < 0.0001$, $p < 0.001$, respectively). When the patients were compared according to their neurological deficit, those with moderate/severe disability were predominantly male ($p < 0.01$).

According to TOAST classification, 35 (28.9%) stroke patients presented LAAS subtype, 21 (17.3%) CEI, 39 (32.2%) LAC, 8 (6.6%) ODE, and 18 (14.9%) UDE. The most common modifiable risk factors for stroke were hypertension (87/71.2%), sedentary lifestyle (68/56.2%), dyslipidemia (45/37.2%), diabetes, (45/37.2%), smoking (26/21.5%), alcohol use (14/11.6%), and acute myocardial

infarction (9/8.0%) and they were not associated with the neurological deficit of the patients. The association between the modifiable risk factors, use of pre-morbid drugs, and clinical outcome with the functional impairment on admission of the patients, using the mRS, is shown in Table 2. The history of acute myocardial infarction before the stroke was more frequent among the patients that presented mRS < 3 than among those with mRS \geq 3 on admission ($p=0.0012$). Additionally, the use of anti-hypertensive drugs before the stroke was more frequent among the patients that presented mRS \geq 3 than those with mRS <3 on admission ($p=0.0112$).

Table 3 shows the inflammatory markers of stroke patients according to neurological impairment on admission. Compared with controls, patients with mild disability showed higher peripheral leukocytes ($p<0.0001$), IL-6 ($p<0.05$), and MMP-9 ($p<0.05$). Compared with controls yet, patients with moderate/severe disability presented higher peripheral leukocytes, hsCRP, ferritin, MMP-9 ($p<0.0001$), ESR, and IL-6 ($p<0.05$). When the patients were compared according to their neurological deficit on admission, those with moderate/severe disability presented higher levels of ESR, hsCRP, and IL-6 ($p<0.05$).

Some of these inflammatory markers presented positive correlation with the functional impairment of patients on admission, such as peripheral leukocytes ($r=0.2588$, $p=0.0061$), ESR ($r=0.3832$, $p=0.0002$), hsCRP ($r=0.3777$, $p<0.0001$), and IL-6 ($r=0.3332$, $p=0.0011$), as shown in Figure 1. In addition, ESR, hsCRP, IL-6, and MMP-9 presented a positive correlation with the difference of the mRS scores obtained at baseline and after three-month follow-up ($r=0.2758$, $p=0.03298$ for ESR; 0.2491 , $p=0.0207$ for hsCRP, $r=0.3549$, $p=0.0007$ for IL-6, and $r=0.2554$, $p=0.0342$ for MMP-9) (Table 4). The moderate/severe functional impairment (mRS \geq 3) and higher peripheral leukocytes, hsCRP, IL-6, and MMP-9 obtained on admission were significantly associated with the outcome after three-month follow-up; those of them were higher among the non survivors than the survivors patients ($p<0.0001$, $p=0.0117$, $p=0.0074$, $p<0.0001$, and $p=0.0435$, respectively) (Figure 2).

Table 1 – Demographic and anthropometric characteristics of acute ischemic stroke patients according to the modified Rankin scale (mRS) at baseline compared to healthy controls

	Control (n=96)	Ischemic stroke patients (n=121)		p value		
		mRS <3 (n=24)	mRS ≥ 3 (n=97)	Control vs mRS <3	Control vs mRS ≥3	mRS <3 vs mRS ≥3
Sex (Female/Male)	73/23	04/20	49/48	<0.0001	<0.001	<0.01
Caucasian/Non Caucasian	80/16	18/06	73/24	NS	NS	NS
Age (years)	69.0 (62.5-75.0)	64.5 (50.5-75.3)	70.0 (61.0-77.0)	NS	NS	NS
Body Mass Index (Kg/m ²)	26.9 (23.8-26.8)	25.2 (22.4-29.8)	25.8 (22.7-29.1)	NS	NS	NS
Waist Circumference (cm)	97.0 (90.5-105.0)	95.0 (88.0-115.0)	108.0 (86.0-120.0)	NS	NS	NS

Categorical variables are expressed as number (n). Continuous variables are expressed median (interquartile range 25%-75%) and are analysed using Kruskal-Wallis test with Dunn's post-test; modified Rankin scale (mRS) < 3: mild disability; mRS ≥3: moderate/severe disability; NS: not significant

Table 2 – Baseline characteristics of acute ischemic stroke patients associated with the functional impairment on admission evaluated using the modified Rankin Scale (mRS)

Variable	Stroke patients			p value
	mRS < 3 (n = 24)	mRS ≥ 3 (n = 97)	Total (n=121)	
Hypertension	17 (70.8)	80 (82.5)	97 (80.2)	0.3193
Smoking	5 (20.8)	21 (21.6)	26 (21.5)	1.000
Sedentary lifestyle	15 (62.5)	53 (54.6)	68 (56.2)	0.6418
Alcoholism	3 (12.5)	11 (11.3)	14 (11.6)	1.000
Dyslipidemia	12 (50.0)	33 (34.0)	45 (37.2)	0.2246
Diabetes	7 (29.2)	38 (39.2)	45 (37.2)	0.5013
Acute myocardial infarction	6 (25.0)	3 (3.1)	9 (7.4)	0.0012
Premorbid drugs				
Antihypertensive	12 (50.0)	76 (78.3)	88 (72.7)	0.0112
Hypoglycemiant	5 (20.8)	23 (23.7)	28 (28.9)	0.9768
Hypolipemiant	7 (29.2)	28 (28.9)	35 (36.1)	0.8241
Antiplatelet	4 (16.7)	27 (27.8)	31 (32.0)	0.3892
Anticoagulant	1 (4.2)	7 (7.2)	8 (8.2)	1.000
Outcome after three-month follow-up				
Number of patients	14 (58.3)	71 (73.2)	85 (70.2)	0.3874
Survivors	10 (71.4)	41 (57.7)	51 (60.0)	
Non survivors	4 (28.6)	30 (42.3)	34 (40.0)	

Data were expressed absolute number (n) and percentage (%) and were analysed with ^aChi-Square test with Yates's correction or Fisher exact Test (p<0.05); mRS < 3: mild disability or independence; mRS ≥ 3: moderate or severe disability or dependence.

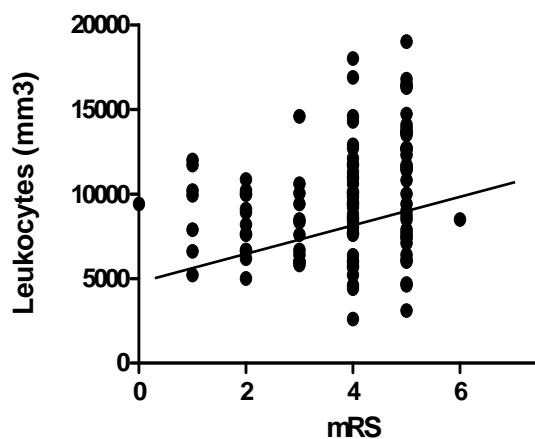
Table 3 – Association between inflammatory markers of acute ischemic stroke patients with the modified Rankin scale (mRS) obtained at baseline

	Control (n=96)	Ischemic stroke patients (n=121)		p value		
		mRS <3 (n=24)	mRS ≥ 3 (n=97)	Control vs mRS <3	Control vs mRS ≥3	mRS <3 vs mRS ≥3
Leukocytes (cells/uL)	7320 (5490-5545)	8900 (6650-10100)	9400 (7550-12650)	<0.0001	<0.0001	NS
Platelets (10 ⁵ cells/ uL)	220 (189-265)	211 (189-296)	225 (186-273)	NS	NS	NS
ESR (mm/ st)	11.0 (6.0-17.0)	8.0 (4.5-15.0)	16.0 (7.0-29.5)	NS	<0.05	<0.05
hsCRP (mg/L)	2.37 (1.10-5.2)	3.38 (1.34-7.63)	10.1 (2.95-232.1)	NS	<0.0001	<0.05
Ferritin (ng/mL)	96.9 (62.4-174.0)	172.3 (67.7-294.2)	189.6 (91.1-360.5)	NS	<0.0001	NS
TNF-α (pg/mL)	2.0 (2.0-6.85)	2.09 (2.00-11.07)	2.0 (2.0-4.46)	NS	NS	NS
IL-6 (pg/mL)	1.05 (1.0-3.18)	8.21 (3.77-16.11)	16.09 (6.17-34.61)	<0.0001	<0.0001	<0.05
MMP-9 (ng/mL)	66.4 (54.5-104.8)	1244.0 (568.0-1734.0)	1482.0 (814.5-1804.0)	<0.05	<0.0001	NS

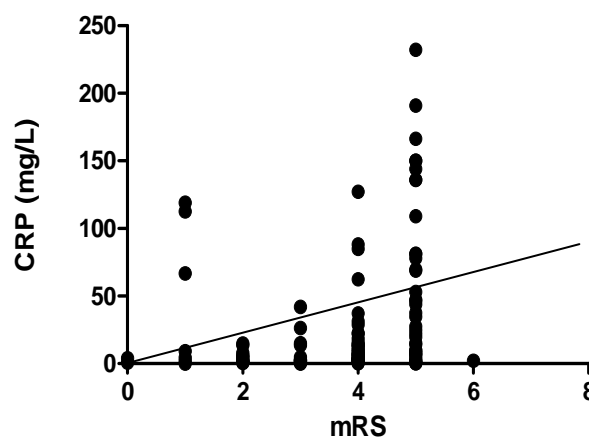
The data are expressed median (interquartile range 25%-75%) and are analysed using Kruskal-Wallis test with Dunn's post-test; modified Rankin scale (mRS) < 3: mild disability; mRS ≥3: moderate/severe disability; ERS: erythrocyte sedimentation rate; hsCRP: high sensitivity C-reactive protein; TNF-α: tumor necrosis factor alpha; IL-6: interleukin 6; MMP-9: matrix metalloproteinase 9; NS: not significant

Figure 1 – Rank' Spearman correlation between the modified Rankin Scale (mRS) and the inflammatory markers on admission in patients with acute ischemic stroke. **A:** peripheral leukocyte counts ($r=0.2968$, $p=0.0061$); **B:** high sensitivity C-reactive protein (hsCRP) ($r=0.3777$, $p<0.0001$); **C:** erythrocyte sedimentation rate (ESR, $r=0.3832$, $p=0.0002$); and **D:** interleukin 6 (IL-6) ($r=0.3232$, $p=0.0011$).

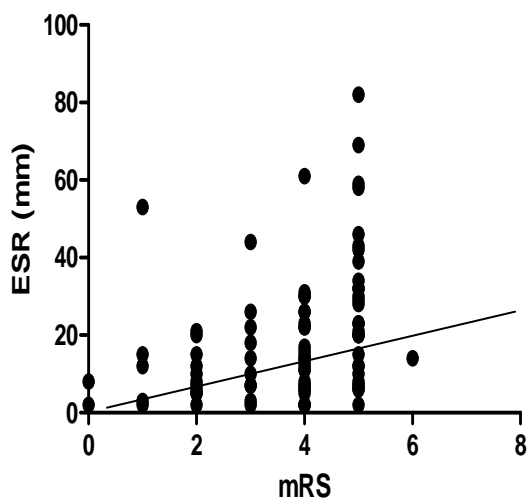
A
 $r=0.2968$, $p=0.0061$



B
 $r=0.3777$, $p<0.0001$



C
 $r=0.3832$, $p=0.0002$



D
 $r=0.3232$, $p=0.0011$

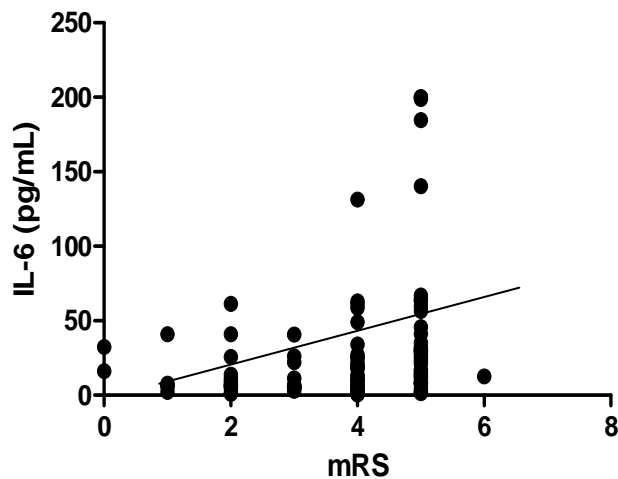
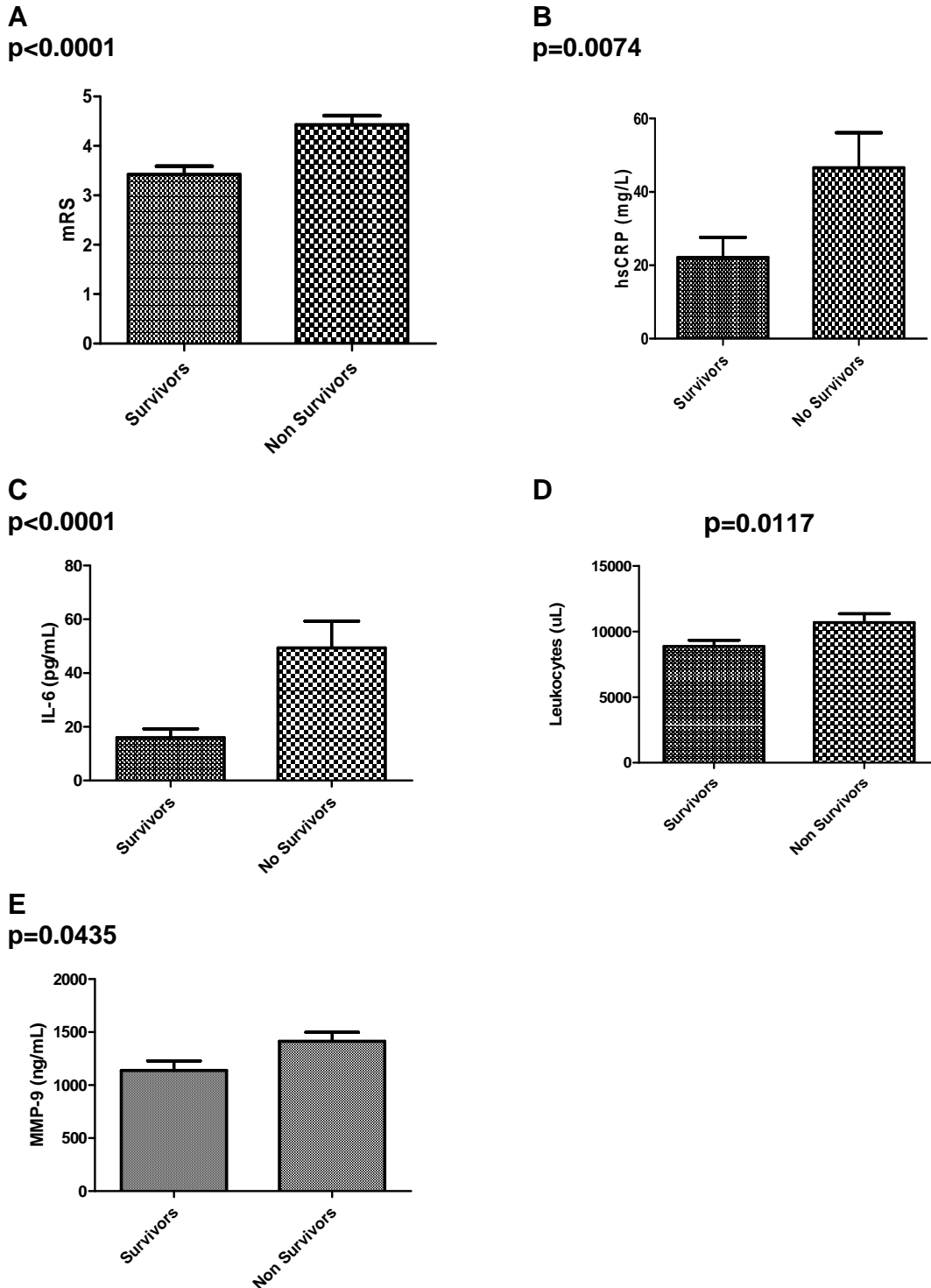


Table 4 – Rank's Spearman correlation between the inflammatory markers of the ischemic stroke patients and the difference of the modified Rankin Scale on admission and after three-month of the stroke

Parameters	Correlation coefficient (r)	p value
Leukocytes (cells /uL)	0.1406	0.1966
Platelets (10 ⁵ cells/ uL)	0.0824	0.4506
ESR (mm)	0.2758	0.0329
hsCRP (mg/L)	0.2491	0.0207
IL-6 (pg/mL)	0.3549	0.0007
TNF- α (pg/mL)	-0.0259	0.8138
Ferritin (ng/mL)	0.0333	0.7861
MMP-9 (ng/mL)	0.2554	0.0342

ESR: erythrocyte sedimentation rate; hsCRP: high sensitivity C-reactive protein; IL-6: interleukin 6; TNF- α : tumor necrosis factor α ; MMP-9: matrix metalloproteinase 9

Figure 2 – Association between functional impairment and inflammatory markers obtained on admission of the acute ischemic stroke patients with short-time outcome. These markers were higher among the non-survivors than the survivors after three-month follow-up. **A:** modified Rankin Scale (mRS, $p < 0.0001$); **B:** high sensitivity C-reactive protein (hsCRP, $p = 0.0074$); **C:** interleukin 6 (IL-6, $p < 0.0001$); **D:** peripheral leukocytes, $p = 0.0117$; and **E:** Metalloproteinase matrix 9 (MMP-9, $p = 0.0435$). The values were expressed as median and interquartile range (25% and 75%).



Discussion

The main findings of the present study were the high levels of peripheral leukocytes, ESR, hsCRP, MMP-9, and especially IL-6 levels, in patients with acute ischemic stroke. In addition, these inflammatory markers were associated with the functional impairment and outcome of the patients, underscoring that these molecules may exert an important role in the pathogenesis and outcome of ischemic stroke. Therefore, they may be analysed in the initial evaluation of the stroke patients to identify those that could benefit with individualized interventions aimed at improving outcome.

The increased peripheral leukocytes obtained in the patients of the present cohort is consistent with previous studies reporting that this marker is independently associated with risk of stroke, even after adjusting for traditional vascular risk factors, such as smoking [49, 50]. Moreover, the peripheral leukocyte count has been considered an independent predictor of long-term ischemic stroke [25] and recurrent ischemic events [51].

In the present study, IL-6 was the unique marker that showed statistically significant difference between all the groups of patients, independently of the grade of functional impairment. This result is in accordance with previous studies and suggests the IL-6 as a potent predictor of the early neuronal deterioration and the worse outcome [28, 52-53]. Cerebral ischemia induces the expression of IL-6 in neurons and astrocytes and the serum of IL-6 levels increase within several days after an ischemic stroke. IL-6 up-regulates the expression of adhesion molecules on endothelial cells, leukocytes, and platelets, during cerebral ischemia, which leads to secondary neuronal damage and correlates with stroke severity, 12 months mortality, clinical outcome, and brain infarct volume [52,54].

The first cells responding to brain ischemia are glial cells, particularly microglia, with transcription of early pro-inflammatory cytokines, such as IL-1 β , TNF- α , and IL-6, able to activate additional inflammatory pathways leading to induction of the positive acute phase proteins, including CRP and ferritin. Compared with controls, stroke patients of the present cohort showed higher levels of hsCRP and ferritin, reflecting the inflammatory state and the hsCRP levels on admission was a significant marker of functional impairment and short-time outcome. These results are in agreement with previous studies, which showed the hsCRP as a predictor of

incident cerebrovascular events in several populations, including stroke [10, 11, 13-18, 55-56].

The hsCRP is a plasma marker for atherothrombotic disease that may reflect the level of inflammatory activity within atherosclerotic plaques and its serum level is a valuable and sensitive indicator of initial and recurrent cerebrovascular events [18, 24, 57-58]. Elevated levels of hsCRP are detected in up to three quarters of patients with acute ischemic stroke and are associated with poor outcome [59].

Ferritin has also been considered a marker to predict early neurological deterioration and plasma levels > 275 ng/mL independently predicted this condition [60]. In the present study, the highest values of this protein obtained among the patients with moderate/severe disability on admission in comparison with controls underscored the importance of this marker in the initial evaluation of stroke patients.

Compared with controls, the higher MMP-9 values obtained in the patients of the present cohort either with mild or with moderate/severe disability, are consistent with previous studies that emphasized the significance of this gelatinase in the ischemic stroke outcome [34, 37, 38, 61-64]. MMP-9, a gelatinase neutrophil-derived blood protein, possesses the ability to activate numerous pro-inflammatory agents as the chemokine CXCL-8 and the cytokines IL-1 β and TNF- α . The upregulation of MMP-9 contribute to infarct extent and BBB breakdown after stroke and high blood levels of this protein were related with more severe stroke [61]. Due to the significant role of the gelatinases, mainly MMP-9, during brain ischemia, their selective inhibition seems to be an interesting approach of treatment of patients with acute ischemic stroke [65].

The present study failed to show increased TNF- α levels among the stroke patients with different functional impairment on admission and after three-month follow-up. This finding was quite unexpected, as TNF- α is considered the principal mediator of neuroinflammation that elicits a cascade of cellular events culminating in neuronal death and has been correlated with infarct size and early neurological worsening [26-27]. It could be hypothesized that serum TNF- α levels probably reflect more the response to the body to the ischemic insult than the extent of ischemic damage [66]. Other explanation for this conflicting result is the variation in the time of the blood sample obtained after the admission of the patients. This cytokine is rapidly expressed in ischemic brain tissue within 1-3 h after ischemia onset [26], and has a two-phase pattern of expression with a second peak at 24-36h and the upregulation

of the TNF receptors is observed thereafter [27]. Therefore, the present result suggest that the TNF- α is not an appropriate as indicator of severity of brain damage in ischemic stroke.

The findings also demonstrated that the most of ischemic stroke patients presented the traditional modifiable risk factors for stroke such as hypertension, obesity, sedentary lifestyle, and diabetes, as reported [9].

The restricted number of patients and the single-point measurement could be the main limitations of this study since repeated measures may be necessary to define the variance for our findings, as well as predictive nature of a biomarker. The release of cytokines and other inflammatory markers is time dependent. As one single sample from each patient was collected within the 24 hours of the admission at the hospital, some results could have been negatively influenced by the study design. The differences between the aforementioned studies may be attributable, in part, to large variations in timing of blood sampling and measurements of functional impairment. However, in support for our findings, several studies previously reported the usefulness of single-point measurement of inflammatory biomarkers in several clinical conditions including atrial fibrillation, congestive heart failure, and acute myocardial infarction [67-69]. Moreover, in further support of our single-point evaluation, other study reported that two markers of inflammation and one marker of thrombosis were highly correlated with stroke at six and 24 h, and that the extended time evolution of TNF- α response in humans, peaking at 2-3 days, sustains our choice to evaluate biomarker plasma levels within 72 h of symptoms onset [70].

Many blood biomarkers candidate for ischemic stroke have been identified; however, none is currently used in clinical practice and part of the challenge arises from the heterogeneity of the etiology of ischemic stroke [71]. A multimarker panel approach may be helpful in order to stratify patients with acute cerebral ischemia who could benefit from urgent care and individualized therapy. The use of biomarkers has made a strong impact in understanding the pathophysiology of stroke and the approach to its treatment [72]. Currently, the only approved pharmacological therapy for acute stroke is thrombolysis [47], which acts mediating recanalization and often induces secondary hemorrhage depending on the infarct size. The identification of clinical and laboratorial biomarkers of acute cerebral ischemia would facilitate the use of time-sensitive reperfusion strategies offering a potential role for improved treatment selection and individualization of therapy [73].

Conclusions

Taken together, high innate immune-inflammatory response was observed among the patients with acute ischemic stroke and the levels of biomarkers assessed in the present study differed in magnitude depending on the severity of the functional impairment and outcome. These findings supported the observations that an increased levels of inflammatory markers, mainly IL-6, hsCRP, and MMP-9, at hospital entry reflect the extent of brain damage at the time of blood sampling and the risk of further tissue disruption and clinical worsening. The use of a combination of these different markers may help to minimize the variability of any individual marker. Moreover, the results suggest that these serum markers may further help in the clinical practice for the acute ischemic stroke management, identifying the patients that could exhibit a worse clinical outcome and reducing complications following acute treatment. Further studies are necessary with a large number of patients to confirm the predictive role of the inflammatory biomarkers also evaluating longer time intervals.

Acknowledgments

The study was supported by Institutional Program for Scientific Initiation Scholarship (PIBIC) of the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), State University of Londrina (PROPPG), and Bayer HealthCare. We thank the University Hospital of State University of Londrina and HUTec Foundation for technical and administrative supports.

Conflict of interest statement

The authors declare that they have no competing interest.

Authors' contributions

Márcio Fransico Lehmann: Conceived and designed the study, enrolled and attended clinically the patients, acquired clinical and imaging data, interpreted the results, drafted and revised the manuscript, and gave final approval for the version to be published;

Johnathan de Sousa Parreira: Enrolled and attended clinically the patients, acquired clinical and imaging data, and gave final approval for the version to be published;

Maria Caroline Martins de Araújo, Carolina Rossato, Jéssica Tavares de Alemida, and Larissa Muliterno Pelegrino: Acquired demographical, epidemiological, and clinical data, and gave final approval for the version to be published;

Erick Frank Bragato: acquired clinical and imaging data, and gave final approval for the version to be published;

Ana Paula Kallaur, Sayonara Rangel Oliveira, Francieli Delongui and Daniela Frizon Alfieri: Collected and processed the blood samples of the patients and healthy controls; and gave final approval for the version to be published;

Helena Kainami Morimoto, Marcell Alysson Batisti Losovoy: Processed the blood samples of the patients and healthy controls, performed the laboratory tests, and gave final approval for the version to be published;

Andréa Name Colado Simão: Conceived and designed the study, performed the performed the laboratory tests and statistical analysis, interpreted the results; and gave final approval for the version to be published;

Damacio Ramón Kaimen-Maciel: Attended the patients, interpreted the imaging data, revised critically the manuscript for important intellectual content, and gave final approval for the version to be published;

Edna Maria Vissoci Reiche: Conceived and designed the study, performed the laboratory tests, interpreted the results, drafted and revised the manuscript, and gave final approval for the version to be published.

References

1. Markus HS. Stroke genetics. *Hum Mol Genet.* 2011; 20: R124-R131.
2. Oliveira-Filho J, Martins SC, Pontes-Neto OM, Longo A, Evaristo EF, Carvalho JJ, Fernandes JG, Zétola VF, Gagliardi RJ, Vedolin L, Freitas GR; Executive Committee from Brazilian Stroke Society and the Scientific Department in Cerebrovascular Diseases. Guidelines for acute ischemic stroke treatment: part I. *Arq Neuro-Psiquiatr* 2012; 70: 621-629.
3. Brazil. Ministry of Health. System of Mortality Information (SIM) and IBGE. [Internet] [accessed 2013 Dec 01]. Available from: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2011/c08.def>.
4. Rohr J, Kittner S, Feeser B, Hebel JR, Whyte MG, Weinstein A, et al. Traditional risk factors and ischemic stroke in young adults. The Baltimore-Washington Cooperative Young Stroke Study. *Arch Neurol.* 1996; 53:603-607.
5. Faraci FM; Lentz SR. Hyperhomocysteinemia, oxidative stress, and cerebral vascular dysfunction. *Stroke* 2004; 35:345-347.
6. Shinozaki K, Naritomi H, Shimizu Takao, Suzuki M, Ikebuchi M, Sawada T, Harano Y. Role of insulin resistance with compensatory hiperinsulinemia in ischemic stroke. *Stroke* 1996; 27:37-43.
7. McIlroy SP, Dynan KB, Lawson JT, Patterson CC, Passmore AP. Moderately elevated plasma homocysteine, methylenetetrahydrofolate reductase genotype, and risk for stroke, vascular dementia, and Alzheimer disease in Northern Ireland. *Stroke* 2002; 33:2351-2356.
8. Wang Q, Tang XN, Yenari MA: The inflammatory response in stroke. *J Neuroimmunol* 2007; 184:53-68.

9. Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, Benjamin EJ, Berry JD, Blaha MJ, et al. Heart Disease and Stroke Statistics -2014 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2014; 129: e28-e292.
10. Muir KW, Weir CJ, Alwan W, Squire IB, Lees KR. C-reactive protein and outcome after ischemic stroke. *Stroke* 1999; 30:981-985.
11. Canova CR, Courtin C, Reinhart WH. C-reactive protein (CRP) in cerebrovascular events. *Atherosclerosis* 1999; 147:49-53.
12. Di Napoli M, Di Gianfilippo G, Sollecito A, Bocola V. C-reactive protein and outcome after first-ever ischemic stroke. *Stroke* 2000; 31:238-239.
13. Di Napoli M, Papa F, Bocola V. C-reactive protein in ischemic stroke: an independent prognostic factor. *Stroke* 2001; 32:917-924.
14. Anuk T, Assayag EB, Rotstein R, Fusman R, Zeltser D, Berliner S, Avitzour D, Shapira I, Arber N, Bornstein NM. Prognostic implications of admission inflammatory profile in acute ischemic neurological events. *Acta Neurol Scand* 2002; 106:196-199.
15. Ceccarelli E, Donati C, Forconi S, Cappelli R, Masotti L. C-reactive protein, physical disability, and prognosis in very old patients with ischemic stroke. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2002; 57:M520-522.
16. Winbeck K, Poppert H, Etgen T, Conrad B, Sander D. Prognostic relevance of early serial C-reactive protein measurements after first ischemic stroke. *Stroke* 2002; 33:2459-2464.
17. Emsley HC, Smith CJ, Gavin CM, Georgiou RF, Vail A, Barberan EM, Hallenbeck JM, del Zoppo GJ, Rothwell NJ, Tyrrell PJ, Hopkins SJ.

An early and sustained peripheral inflammatory response in acute ischaemic stroke: relationships with infection and atherosclerosis. *J Neuroimmunol* 2003; 139:93-101.

18. Di Napoli M, Schwaninger M, Cappelli R, Ceccarelli E, Di Gianfilippo G, Donati C, Emsley HC, Forconi S, Hopkins SJ, Masotti L, Muir KW, Paciucci A, Papa F, Roncacci S, Sander D, Sander K, Smith CJ, Stefanini A, Weber D. Evaluation of C-reactive protein measurement for assessing the risk and prognosis in ischemic stroke: a statement for health care professionals from the CRP Pooling Project members. *Stroke* 2005; 36:1316–1329.

19. Everett BM, Kurth T, Buring JE, Ridker PM. The relative strength of C-reactive protein and lipid levels as determinants of ischemic stroke compared with coronary heart disease in women. *JACC* 2006; 48:2235-2242.

20. Tuttolomondo A, Raimondo DD, Pecoraro R, Serio A, D'Aguanno G, Pinto A, Licata G. Immune-inflammatory markers and arterial stiffness indexes in subjects with acute ischemic stroke. *Atherosclerosis* 2010; 213:311-318.

21. Abubakar AS, Okubadejo NU, Ojo OO, Oladipo O, Ojini FI, Danesi MA. Relationship between admission serum C-protein and short-term outcome following acute ischemic stroke at a tertiary health institution in Nigeria. *Nigerian Journal of Clinical Practice* 2013; 16: 320-324.

22. Chaudhuri JR, Mridula KR, Umamahesh M, Swathi A, Balaraju B, Bandaru VC. High sensitivity C-reactive protein levels in Acute Ischemic Stroke and subtypes: A study from a tertiary care center. *Iran J Neurol* 2013;12:92-97.

23. Woodward M, Lowe GD, Campbell DJ, Colman S, Rumley A, Chalmers J, et al. Associations of inflammatory and hemostatic variables with the risk of recurrent stroke. *Stroke* 2005;36:2143-2137.

24. Welsh P, Lowe GD, Chalmers J, Campbell DJ, Rumley A, Neal BC, et al. Associations of proinflammatory cytokines with the risk of recurrent stroke. *Stroke* 2008; 39: 2226-2230.

25. Wu TH, Chien KL, Lin HJ, Hsu HC, Su TC, Chen MF, Lee YT. Total white blood cell count or neutrophil count predicts ischemic stroke events among adult Taiwanese: report from a community-based cohort study. *BMC Neurol* 2013; 13:7.
26. Liu T, Clark RK, McDonnell PC, Young PR, White RF, Barone FC, Feuerstein GZ. Tumor necrosis factor-alpha expression in ischemic neurons. *Stroke* 1994; 25: 1481-1488.
27. Murakami Y, Saito K, Hara A, Zhu Y, Sudo K, Niwa M, Fujii H, Wada H, Ishiguro H, Mori H, Seishima M. Increases in tumor necrosis factor-alpha following transient global cerebral ischemia do not contribute to neuron death in mouse hippocampus. *J Neurochem* 2005; 93: 1616-1622.
28. Tuttolomondo A, Di Raimondo D, Pecoraro R, Arnao V, Pinto A, Licata G. Inflammation in ischemic stroke subtypes. *Curr Pharm Des* 2012; 18:4289-4310.
29. Montaner J, Fernandes-Cadenas I, Molina CA, Ribo M, Huertas R, Roseli A, et al. Poststroke C-reactive protein is a powerful prognostic tool among candidates for thrombolysis. *Stroke* 2006; 37:1205-1210.
30. Topakian R, Strasak AM, Nussbaumer K, Haring HP, Aichner FT. Prognostic value of admission C-reactive protein in stroke patients undergoing thrombolysis. *J Neurol* 2008; 255:1190-1196.
31. Rosenberg GA, Estrada EY, Dencoff JE. Matrix metalloproteinases and TIMPs are associated with blood-brain barrier opening after reperfusion in rat brain. *Stroke* 1998; 29: 2189-2195.
32. Castellanos M, Castillo J, Garcia MM, Leira R, Serena J, Chamorro A, et al. Inflammation-mediated damage in progressing lacunar infarctions. *Stroke* 2002; 33:982-987.

33. Montaner J, Rovira A, Molina CA, Arenillas JF, Ribó M, Chacón P, Monasterio J, Alvarez-Sabín J. Plasmatic level of neuroinflammatory markers predicts the extent of diffusion-weighted image lesions in hyperacute stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 2003; 23:1403-1407.
34. Morancho A, Rosell A, García-Bonilla L, Montaner J. Metalloproteinase and stroke infarct size: role for anti-inflammatory treatment? *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1207:123-133.
35. Montaner J, Alvarez-Sabín J, Molina CA, Anglés A, Abilleira S, Arenillas J, Monasterio J. Matrix metalloproteinase expression is related to hemorrhagic transformation after stroke. *Stroke* 2001; 32:2762-2767.
36. Vukasovic I, Tesija-Kuna A, Topic E, Supanc V, Demarin V, Petrovcic M. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in different acute stroke subtypes. *Clin Chem Lab Med* 2006; 44:428-434.
37. Ramos-Fernandez M, Bellolio MF, Stead LG. Matrix metalloproteinase-9 as a marker for acute ischemic stroke: a systematic review. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2011; 20:47-54.
38. Demir R, Ulvi H, Özel L, Özdemir G, Güzelcik M, Aygül R. Relationship between plasma metalloproteinase-9 levels and volume and severity of infarct in patients with acute ischemic stroke. *Acta Neurol Belg* 2012; 112:351-356.
39. Ladenvall C, Jood K, Blomstrand C, Nilsson S, Jern C, Ladenvall P. Serum C-reactive protein concentration and genotype in relation to ischemic stroke subtype. *Stroke* 2006; 37:2018-2023.
40. Waterer GW, Wunderink RG. Science review: Genetic variability in the systematic inflammatory response. *Critical Care* 2003; 7(4): 308-14.
41. Pena SD, Di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, Genro JP, Hutz MH, Kehdy Fde S, Kohlrausch F, Magno LA, Montenegro RC, Moraes MO, de Moraes ME, de Moraes

MR, Ojopi EB, Perini JA, Racciopi C, Ribeiro-Dos-Santos AK, Rios-Santos F, Romano-Silva MA, Sortica VA, Suarez-Kurtz G. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PLoS One* 2011; 6: e17063.

42. Brazil. IBGE. Brazilian Institute of Geography and Statistics. (2011) Characteristics of the Population and Households: Results of the Universe. Available in: http://www.ibge.gov.br/english/estatistica/populacao/censo2010/caracteristicas_da_populacao/default_caracteristicas_da_populacao.shtm. Accessed in July 16, 2013.

43. Adams HP Jr, Bendixen BH, Kappelle JJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, Marsh EE 3rd. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions of use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke* 1993; 24: 35-41.

44. Bonita R, Beaglehole R. Modification of Rankin Scale: Recovery of motor function after stroke. *Stroke* 1988; 19:1497-1500.

45. Oh MS, Yu KH, Chu MK, Ma HI, Kim YJ, Kim JY, Lee BC, Mi SO, Kyung-Ho Y, Min-Kyung C, Hyeo-Il M, Yun JK, Joo YK, Byung-Chul L. Long-term prognosis of symptomatic isolated middle cerebral artery disease in Korean stroke patients. *BMC Neurology* 2011, 11:138.

46. Uyttenboogaart M, Stewart RE, Vroomen PC, De Keyser J, Luijckx GJ. Optimizing cutoff scores for the Barthel index and the modified Rankin scale for defining outcome in acute stroke trials. *Stroke* 2005; 6:1984-1987.

47. Brazil. Manual de Rotinas para atendimento ao AVC. Editora Ministério da Saúde. Brasília; Ministério da Saúde; 2013.

48. Pickering TG, Hall JE, Appel LJ, Falkner B, Graves J, Hill MN, Jones DW, Kurtz T, Shpes SG, Roccella EJ. Recommendation for blood pressure measurement in humans and experimental animals. Part 1: blood pressure measurement in humans: a statement for professionals from the Subcommittee of Professional and Public

Education of the American Heart Association Council on High Blood Pressure Research. *Hypertension* 2005; 45:142-161.

49. Elkind MS, Sciacca R, Boden-Albala B, Homma S, Di Tullio MR. Leukocyte count is associated with aortic arch plaque thickness. *Stroke* 2002;33:2587-2592.

50. Rodrigues-Yanes M, Castellanos M, Blanco M, Garcia MM, Nombela F, et al. New-onset hypertension and inflammatory response/poor outcome in acute ischemic stroke. *Neurology*. 2006; 67(11):1973-8.

51. Grau AJ, Boddy AW, Dukovic DA, Buggle F, Lichy C, Brandt T, Hacke W; CAPRIE Investigators. Leukocyte count as an independent predictor of recurrent ischemic events. *Stroke* 2004; 35:1147-1152.

52. Smith CJ, Emsley HC, Gavin CM, Georgiou RF, Vail A, Barberan EM, Del Zoppo GJ, Hallenbeck JM, Rothwell NJ, Hopkins SJ, Tyrrell PJ. Peak plasma interleukin-6 and other peripheral markers of inflammation in the first week of ischemic stroke correlate with brain infarct volume, stroke severity and long-term outcome. *BMC Neurology* 2004; 4:2.

53. Licatta G, Tuttolomondo A, Di Raimondo D, Corrao S, Di Sciacca; Pinto A. Immuno-inflammatory activation in acute cardio-embolic strokes in comparison with other subtypes of ischemic stroke. *Tromb Haemost*. 2009; 101:929-937.

54. Castillo J, Dávalos A, Alvarez-Sabín J, Pumar JM, Leira R, Silva Y, Montaner J, Kase CS. Molecular signatures of brain injury after intracerebral hemorrhage. *Neurology* 2002; 58: 624-629.

55. Ridker PM, Buring JE, Shih J, Matias M, Hennekens CH. Prospective study of C-reactive protein and the risk of future cardiovascular events among apparently healthy women. *Circulation* 1998;98:731-733.

56. Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med* 2000;342:836-843.
57. Rost NS, Wolf PA, Kase CS, Kelly-Hayes M, Silbershatz H, Massaro JM, et al. Plasma concentration of C-reactive protein and risk of ischemic stroke and transient ischemic attack: the Framingham study. *Stroke*. 2001; 32:2575–2579.
58. Arenillas JF, Alvarez-Sabín J, Molina CA, Chacón P, Montaner J, Rovira A, Ibarra B, Quintana M. C-reactive protein predicts further ischemic events in first-ever transient ischemic attack or stroke patients with intracranial large-artery occlusive disease. *Stroke* 2003; 34: 2463–2468.
59. den Hertog HM, van den Herik EG, Dippel DW, Koudstaal PJ, de Maat MP. Variation in the C-reactive protein gene is associated with serum levels of CRP in patients with acute ischemic stroke. *Cerebrovasc Dis* 2010; 29:372-375.
60. Dávalos A, Castillo J, Marrugat J, Fernandez-Real JM, Armengou A, Cacabelos P, Rama R. Body iron stores and early neurologic deterioration in acute cerebral infarction. *Neurology* 2000; 54:1568-1574.
61. Lucivero V, Prontera M, Mezzapesa DM, Petruzzelis M, Sancilio M, Tielli A, Di Noia SD, Riggieri M, Federico F. Different roles of matrix metalloproteinases –2 and –9 after human ischemic stroke. *Neurol Sci* 2007; 28: 165-170.
62. El Ali A, Doepfner TR, Zechariah A, Hermann DM. Increased blood-brain barrier permeability and brain edema after focal cerebral ischemia induced by hyperlipidemia: role of lipid peroxidation and calpain-1/2, matrix metalloproteinase-2/9, and RhoA overactivation. *Stroke* 2011;42:3238-3244.
63. Cojocaru IM, Cojocaru M, Sapira V, Socoliuc G, Herteau C, Paveliu S. Changes in plasma matrix metalloproteinase-9 levels in patients with acute ischemic stroke. *Rom J Intern Med* 2012; 50:155-158.

64. Sapojnikova N, Kartvelishvili T, Asatiani N, Zinkevich V, Kalandadze I, Gugutsidze D, Shakarishvili R, Tsiskaridze A. Correlation between MMP-9 and extracellular cytokine HMGB1 in prediction of human ischemic stroke outcome. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1842:1379-1384.
65. Kurzepa J, Kurzepa J, Golab P, Czerska S, Bielewicz J. The significance of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in the ischemic stroke. *Int J Neurosci* 2014; 124:707-716.
66. Intiso D, Zarrelli MM, Lagioia G, Di Rienzo F, Checchia De Ambrosio C, Simone P, Tonalì P, Cioffi Daggar RP. Tumor necrosis factor alpha serum levels and inflammatory response in acute ischemic stroke patients. *Neurol Sci* 2004; 24:390-396.
67. Jørgensen HS, Nakayama H, Reith J, Raaschou HO, Olsen TS. Acute stroke with atrial fibrillation. The Copenhagen Stroke Study. *Stroke* 1996; 27:1765-1769.
68. Chin BS, Blann AD, Gibbs CR, Chung NA, Conway DG, Lip GY. Prognostic value of interleukin-6, plasma viscosity, fibrinogen, von Willebrand factor, tissue factor and vascular endothelial growth factor levels in congestive heart failure. *Eur J Clin Invest* 2003; 33:941-948.
69. Conway DS, Buggins P, Hughes E, Lip GY. Prognostic significance of raised plasma levels of interleukin-6 and C-reactive protein in atrial fibrillation. *Am Heart J* 2004; 148:462-466.
70. Lynch JR, Blessing R, White WD, Grocott HP, Newman MF, Laskowitz DT. Novel diagnostic test for acute stroke. *Stroke* 2004; 35:57-63.
71. Jickling GC, Sharp FR. Blood biomarkers of ischemic stroke. *Neurotherapeutics* 2001; 8: 349-360.

72. Whiteley W, Wardlaw J, Dennis M, Lowe G, Rumley A, Sattar N, Welsh P, Green A, Andrews M, Sandercock P. The use of blood biomarkers to predict poor outcome after acute transient ischemic attack or ischemic stroke. *Stroke*. 2012; 43:86-91.

73. Kisialiou A, Pelone G, Carrizzo A, Grillea G, Trimarco V, Marino M, Bartolo M, De Nunzio AM, Grella R, Landolfi A, Puca A, Colonnese C, Vecchione C. Blood biomarkers in acute ischemic stroke patients: higher is worse or better? *Immun Ageing* 2012; 9:22.

6 CONCLUSÕES

O presente estudo permite as seguintes conclusões:

- 1) Entre os pacientes com AVCI, 68 (56,2%) eram homens e 53 (43,8%) eram mulheres;
- 2) Os riscos modificáveis mais frequentes para AVCI foram hipertensão (71,2%), sedentarismo (56,2%), dislipidemia (37,2%), diabetes (37,2%), tabagismo (21,5%), etilismo (11,6%) e infarto agudo do miocárdio (8,0%);
- 3) Segundo os subtipos do AVCI, 28,9% dos pacientes foram classificados como LAAS, 17,3% como CEI, 39 como LAC, 6,6% como ODE e 14,9% como UDE.
- 4) Pacientes Caucasianos foram mais frequentes entre os que apresentaram o subtipo LAC; pacientes com o subtipo LAAS mostraram maior déficit neurológico que os com LAC e Hipertensão e sedentarismo foram associados com os subtipos LAAS, LAC e CEI de AVC; os pacientes com LAAS apresentaram maiores taxas de mortalidade quando comparados com os pacientes com LAC (45,7% vs 20,5%, $p=0,0391$, OR 0,3.263 (95%CI: 1,173-9,078));
- 5) Níveis de insulina foram mais elevados nos pacientes com LAAS vs. LAC e nos pacientes com LAC vs. CEI e os níveis de CT foram menores nos pacientes com LAC vs. CEI;
- 6) Hiperglicemia, baixos níveis de HDL-C e diminuição de ferro sérico foram associados com os subtipos LAAS, LAC e CEI de AVCI;
- 7) Os níveis dos marcadores inflamatórios como leucócitos periféricos, VHS, usPCR, TNF- α , IL-6, ferritina e MMP-9 não diferiram de acordo com os subtipos de AVCI; no entanto, foram diferentes de acordo com o grau de déficit neurológico dos pacientes. A contagem de leucócitos periféricos e MMP-9 foram mais elevadas entre os pacientes com AVCI com mRS < 3 e com mRS \geq 3 comparados aos controles; a VHS, usPCR, ferritina, e MMP9 foram mais elevadas em pacientes com déficit neurológico moderado/grave quando comparados com os de déficit neurológico leve, níveis de VHS, usPCR e IL-6 foram mais elevados entre os pacientes com AVCI com mRS \geq 3 comparados aos pacientes com mRS < 3;

- 8) A IL-6 foi o único marcador que se mostrou aumentado nos pacientes com AVCI tanto nos pacientes com leve quanto nos com moderado/grave déficit neurológico quando comparada aos controles, sendo também significativamente mais elevada nos pacientes com moderado/grave déficit neurológico quando comparados aos com leve déficit neurológico;
- 9) Níveis séricos de ferritina foram mais elevados nos pacientes com maior déficit neurológico comparados aos controles;
- 10) Verificou-se uma correlação positiva entre o déficit neurológico dos pacientes obtido na admissão hospitalar com a contagem de leucócitos periféricos, VHS, usPCR e IL-6; VHS, usPCR e IL-6 também apresentaram correlação positiva com a diferença entre os escores do mRS obtidos na admissão e após três meses de seguimento;
- 11) O déficit neurológico e os marcadores inflamatórios como leucócitos periféricos, usPCR, IL-6 e MMP-9 obtidos na admissão dos pacientes apresentaram significativa associação com o desfecho após três meses do evento isquêmico. Os níveis maiores de mRS e níveis séricos mais elevados destes marcadores foram significativamente maiores nos pacientes que não sobreviveram do que nos que sobreviveram.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados confirmam a extensa resposta inflamatória e alterações metabólicas associadas ao AVCI e que mecanismos inflamatórios exercem importante papel na patogênese e evolução clínica do AVCI. Alterações quantitativas de células e moléculas consideradas como marcadores do perfil inflamatório e metabólico contribuem para o desenvolvimento e evolução clínica no AVCI e podem ser utilizados na avaliação inicial dos pacientes com diagnóstico de AVCI para identificar os que podem se beneficiar com estratégias terapêuticas individualizadas que levem em consideração a magnitude destas alterações e que possam modular os mecanismos lesivos após o evento isquêmico.

REFERÊNCIAS

- Aaronson JA, van Bennekom CA, Hofman WF, van Bezeij T, van den Aardweg JG, Groet E, Kylstra WA, Schmand B. Obstructive sleep apnea is related to impaired cognitive and functional status after stroke. *Sleep* 2014; pii:sp-00600-14.
- Abramczuk B, Villela E. A luta contra o AVC no Brasil. *Com Ciência* v. 109, 2009. Disponível em: <http://comciencia.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-76542009000500002&lng=pt&nrm=iso>. ISSN 1519-7654.
- Abubakar SA, Okubadejo NU, Ojo OO, Oladipo O, Ojini FI, Danesi MA. Relationship between admission serum C-protein and short-term outcome following acute ischemic stroke at a tertiary health institution in Nigeria. *Niger J Clin Pract* 2013;16:320-324.
- Adams HP Jr, Bendixen BH, Kappelle JJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, Marsh EE 3rd. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions of use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke* 1993; 24: 35-41.
- Almeida AG de, Dal Pizzol A, Valler L. Acidente vascular cerebral isquêmico agudo: fatores de risco. In: Nasi LA (org). *Rotinas em Unidade Vascular*. Porto Alegre: Artmed Editora, p. 287-295. 2012.
- American Heart Association Stroke Council. Expansion of the time window for treatment of acute ischemic stroke with intravenous tissue plasminogen activator. A science advisory from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* 2009; 40.
- Arenillas JF, Alvarez-Sabín J, Molina CA, Chacón P, Montaner J, Rovira A, Ibarra B, Quintana M. C-reactive protein predicts further ischemic events in first-ever transient ischemic attack or stroke patients with intracranial large-artery occlusive disease. *Stroke* 2003; 34: 2463–2468.
- Bazzoni F, Beutler B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Engl J Med* 1996; 334: 1717–1725.
- Beamer NB, Coull BM, Clark WM, Briley DP, Wynn M, Sexton G. Persistent inflammatory response in stroke survivors. *Neurology* 1998; 50:1722-1728.
- Benveniste EN. Cytokines actions in the central nervous system. *Cytokine Growth Factor Rev* 1998; 9:259-275.
- Bonita R, Beaglehole R. Modification of Rankin Scale: Recovery of motor function after stroke. *Stroke* 1988; 19:1497-1500.
- Bowes MP, Rothlein R, Fagan SC, Zivin JA. Monoclonal antibodies preventing leukocytes activation reduce experimental neurological injury and enhance efficacy of thrombolytic therapy. *Neurology* 1995; 45:815-819.

Brasil. Departamento de Análise de Situação de Saúde. Sistemas de informação sobre mortalidade (SIM) e nascidos vivos (SINASC). Brasília Ministério da Saúde; 2010.

Brasil. Ministério da Saúde. Plano de ações estratégicas para o enfrentamento das doenças crônicas não transmissíveis no Brasil 2011-2012. Brasília; 2011.

Brasil. Manual de Rotinas para atendimento ao AVC. Editora Ministério da Saúde. Brasília; Ministério da Saúde; 2013.

Brasil. Ministério da Saúde – Sistema de Informações de Mortalidade (SIM) e IBGE. [Internet] Acesso 01 Dezembro 2013. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2011/c08.def>.

Brazil. Ministry of Health. (2004). National Health Surveillance Agency Board: Resolution RDC no. 153, June 14, 2004. Official Gazette: 24 June, 2004, Brazil.

Brott T, Adams HP Jr, Olinger CP. Measurement of acute cerebral infarction: a clinical examination scale. *Stroke* 1989; 20:864-870.

Cabral NL. Epidemiologia e impacto da doença cerebrovascular no Brasil e no mundo. *Com Ciência* 2009; 109:e5.

Carlson NG, Wiegand WA, Chen J, Bacchi A, Rogers SW, Gahring LC. Inflammatory cytokines IL-1 alpha, IL-1 beta, IL-6, and TNF-alpha impart neuroprotection to an excitotoxin through distinct pathways. *J Immunol* 1999; 163:3963-3968.

Castellanos M, Leira R, Tejada J, Gil-Peralta A, Dávalos A, Castillo J, et al. Predictors of good outcome in medium to large spontaneous supratentorial intracerebral haemorrhages. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2002b; 76: 691-695.

Castellanos M, Castillo J, Garcia MM, Leira R, Serena J, Chamorro A, et al. Inflammation-mediated damage in progressing lacunar infarctions. *Stroke* 2002a; 33:982-987.

Castellanos M, Leira R, Serena J, Pumar JM, Lizasoain I, Castillo J, Dávalos A. Plasma metalloproteinase-9 concentration predicts hemorrhagic transformation in acute ischemic stroke. *Stroke* 2003; 34:40-46

Castellanos M, Leira R, Tejada J, Gil-Peralta A, Dávalos A, Castillo J, for the Stroke Cerebrovascular Diseases Group of the Spanish Neurological Society. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005; 76: 691-695.

Castillo J, Dávalos A, Alvarez-Sabín J, Pumar JM, Leira R, Silva Y, Montaner J, Kase CS. Molecular signatures of brain injury after intracerebral hemorrhage. *Neurology* 2002; 58: 624-629.

Cavender DE, Edelbaum D, Ziff M. Endothelial cell activation induced by tumor necrosis factor and lymphotoxin. *Am J Pathol* 1989; 134: 551-560.

Cojocaru IM, Cojocaru M, Sapira V, et AL. Changes in Plasma Matrix Metalloproteinase-9 Leves in Patient with Acute Ischemic Stroke. *Rom JIntern Med* 2012; 50:155-158.

Culebras A. Sleep apnea and stroke. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2015; 15:503.

Dandona P, Chaudhuri A Ghanin H, Mohanty P. Proinflammatory effects of glucose and the anti-inflammatory effects of insulin: relevance to cardiovascular disease. *Am J Cardiol* 2007; 99 (Suppl): 15B-26.

Danesh J, Collins R, Appleby P, Peto R. Association of fibrinogen, C-reactive protein, albumin, or leukocyte count with coronary heart disease: meta-analysis of prospective studies. *JAMA* 1998; 279:1477-1482.

Dávalos A, Castillo J, Marrugat J, Fernandez-Real JM, Armengou A, Cacabelos P, Rama R. Body iron stores and early neurologic deterioration in acute cerebral infarction. *Neurology* 2000; 54:1568-1574.

Davies CA, Loddick SA, Toulmond S, Stroemer RP, Hunt J, Rothwell NJ. The progression and topographic distribution of interleukin-1beta expression after permanent middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999; 19:87-98.

DeGraba T. J. Expression of inflammatory mediators and adhesion molecules in human atherosclerotic plaque. *Neurology* 1997;49: S515–S519.

DeGraba TJ. The role of inflammation after acute stroke. Utility of pursuing antiadhesion molecule therapy. *Neurology*1998; 51 Suppl 3:S62-S68.

Di Napoli M, Papa F, Bocola V. C-reactive protein in ischemic stroke: an independent prognostic factor. *Stroke* 2001; 32:917-924.

Di Napoli M, Schwaninger M, Cappelli R, Ceccarelli E, Di Gianfilippo G, Donati C, Emsley HC, Forconi S, Hopkins SJ, Masotti L, Muir KW, Paciucci A, Papa F, Roncacci S, Sander D, Sander K, Smith CJ, Stefanini A, Weber D. Evaluation of C-reactive protein measurement for assessing the risk and prognosis in ischemic stroke: a statement for health care professionals from the CRP Pooling Project members. *Stroke* 2005; 36:1316–1329.

Edwards RL, Rickles FR, Bobrove AM. Mononuclear cell tissue factor: cell origin and requirements for activation. *Blood* 1979; 54: 359-370.

El Ali A, Doeppner T R, Zechariah A, Hermann D M. Increased blood-brain barrier edema after focal cerebral ischemia induced by hiperlipidemia: role of lipid peroxidation and calpain 1/2, matrix metalloproteinase-2/9, and rhoA overactivation. *Stroke* 2011; 42:3238-3244.

El Khoury J, Hickman SE, Thomas CA, Loike JD, Silverstein SC. Microglia, scavenger receptors, and the pathogenesis of Alzheminer's disease. *Neurobiol Aging* 1998; 19:581-584.

Emsley HC, Smith CJ, Georgiou RF, Vail A, Hopkins SJ, Rothwell NJ, Tyrrell PJ. A randomized phase II study of interleukin-1 receptor antagonist in acute stroke patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005; 76:1366-1372.

Enlimomab AST. Use of anti-ICAM-1 therapy in ischemic stroke: results of the Enlimomab Acute Stroke Trial. *Neurology* 2001; 57:1428-1434.

Ernst E, Hammerschmidt DE, Bagge U, Matrai A, Dormandy JA. Leukocytes and the risk of ischemic diseases. *JAMA* 1987; 257:2318-2324.

Everett BM, Kurth T, Buring JE, Ridker PM. The relative strength of C-reactive protein and lipid levels as determinants of ischemic stroke compared with coronary heart disease in women. *JACC* 2006; 48:2235-2242.

Faraci FM, Lentz SR. Hyperhomocysteinemia, oxidative stress, and cerebral vascular dysfunction. *Stroke* 2004; 35:345-347.

Festa A, D'Agostino R, Howards G, Mykkanen L, Tracy RP, Haffner SM. Chronic subclinical inflammation as part of the insulin resistance syndrome. The insulin resistance atherosclerosis study (IRAS). *Circulation* 2000; 102:42-47.

Flex A, Gaetani E, Papaleo P, Straface G, Proia AS, Pecorini G, Tondi P, Pola P, Pola R. Proinflammatory genetic profiles in subjects with history of ischemic stroke. *Stroke* 2004; 35:2270-2275.

Frangogiannis NG, Smith CW, Entman ML. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2002; 53:31-47.

Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med* 1999; 340:448-454.

Gahring LC, Carlson NG, Kulmar RA, Rogers SW. Neuronal expression of tumor necrosis factor alpha in the murine brain. *Neuroimmunomodulation*, 1996; 3:289-303.

Gan R, Sacco RL, Kargman DE, Roberts JK, Boden-Albala B, Gu Q. Testing the validity of the lacunar hypothesis: the Northern Manhattan Stroke Study experience. *Neurology* 1997; 48:1204-1211.

Garcia JH, Kamijyo Y. Cerebral infarction: evolution of histopathological changes after occlusion of a middle cerebral artery in primates. *J Neuropathol Exp Neurol* 1974; 33: 408-421.

Garritano CR, Luz PM, Pires MLE, Barbosa MTS, Batista KM. Análise da tendência da mortalidade por acidente vascular cerebral no Brasil no século XXI. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 2012; 98:519-527.

Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, Benjamin EJ, Berry JD, Blaha MJ, et al. Heart disease and stroke statistics -2014 update: A report from the American Heart Association. *Circulation* 2014; 129:e28-e292.

Grau AJ, Boddy AW, Dukovic DA, Buggle F, Lichy C, Brandt T, Hacke W; CAPRIE Investigators. Leukocyte count as an independent predictor of recurrent ischemic events. *Stroke* 2004; 35:1147-1152.

Haffner SM, Miettinen H, Stern MP. The homeostasis model in San Antonio Heart Study. *Diabetes Care*. 1997; 20:1087-1092.

Hallenbeck JM. The many faces of tumor necrosis factor in stroke. *Nat Med* 2002; 8: 1363-1368.

Hallenbeck JM. Inflammatory reactions at the blood-endothelial interface in acute stroke. *Adv Neurol*. 1996; 71:281-97.

Halliwell B, Gutteridge JM. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4^a ed., Oxford University Press, 2007.

Han HS, Yenari MA. Cellular targets of brain inflammation in stroke. *Curr Opin Investig Drugs* 2003; 4:522-529.

Hassan A, Markus HS. Genetics and ischemic stroke. *Brain* 2000; 123: 1784-1812.

Hasan N, McColgan P, Bentley P, Edwards RJ, Sharma P. Towards the identification of blood biomarkers for acute stroke in humans: a comprehensive systematic review. *Br J Clin Pharmacol* 2012; 74:230-240.

Herrmann O, Tarabin V, Suzuki S, Attigah N, Coserea I, Schneider A, Vogel J, Prinz S, Schwab S, Monyer H, Brombacher F, Schwaninger M. Regulation of body temperature and neuroprotection by endogenous interleukin-6 in cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2003; 23:406-415.

Homocysteine Studies Collaboration. Homocysteine and Risk of Ischemic Heart Disease and Stroke. A Meta-analysis The Homocysteine Studies Collaboration *JAMA* 2002; 288:2015-2022.

Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. Increase adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 1995; 95: 2409-2415.

Huang G, Zhong XN, Zhong B, Chen YQ, Liu ZZ, Su L, Ling ZY, Cao H, Yin YH. Significance of white blood cell count and its subtypes in patients with acute coronary syndrome. *Eur J Clin Invest*. 2009; 39:348-358.

Jackson CA, Hutchison A, Dennis MS, Wardlaw JM, Lindgren A, Norrving B, Anderson CS, Hankey GJ, Jamrozik K, Appelros P, Sudlow CLM. Different risk factor profiles in ischemic stroke subtypes. Evidence for a distinct lacunar arteriopathy? *Stroke* 2010; 41:624-629.

Jickling GC, Sharp FR. Blood biomarkers of ischemic stroke. *Neurotherapeutics* 2001; 8: 349-360.

John GR, Chen L, Riviuccio MA, Melendez-Vasquez CV, Hartley A, Brosnan CF. Interleukin-1beta induces a reactive astroglial phenotype via deactivation of the Rho GTPase-Rock axis. *J Neurosci* 2004; 24:2837-28345.

Kelly PJ, Morrow JD, Ning M, Koroshetz W, Lo EH, Terry E, et al. Oxidative stress and matrix metalloproteinase-9 in acute ischemic stroke: The biomarker evaluation for antioxidant therapies in stroke (BEAT-Stroke) Study. *Stroke* 2008; 39:100-104.

Kim JS. Cytokines and adhesion molecules in stroke and related diseases. *J Neurol Sci* 1996; 137:69-78.

Krazt A, Campos-Neto A, Hanson MS, Ruddle NH. Chronic inflammation caused by lymphotoxin is lymphoid neogenesis. *J Exp Med* 1996; 183: 1461-1472.

Kreutzberg GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 1996; 19:312-318.

Lange LA, Carlson CS, Hindorff LA, Lange EM, Walston J, Durda JP, et al. Association of polymorphisms in the CRP gene with circulating C-reactive levels in cardiovascular events. *JAMA* 2006; 296:2703-2711.

Lewandowski C, Barsan W. Treatment of acute ischemic stroke. *Ann Emerg Med* 2001; 37:202-216.

Leys D, Bandu L, Henon H, Lucas C, Mounier-Vehier F, Rondepierre P, Godefroy O. Clinical outcome in 287 consecutive young adults (15 to 45 years) with ischemic stroke. *Neurology* 2002; 59:26-33.

Liu T, Clark RK, McDonnell PC, Young PR, White RF, Barone FC, Feuerstein GZ. Tumor necrosis factor-alpha expression in ischemic neurons. *Stroke* 1994; 25: 1481-1488.

Liu KJ, Rosberg GA. Matrix metalloproteinases and free radicals in cerebral ischemia. *Free Radical Biology & Medicine* 2005; 39: 71-80.

Lucivero V, Prontera M, Mezzapesa DM, Petruzzellis M, Sancilio M, Tinelli A, et al. Different roles of matrix metalloproteinases-2 and -9 after human ischaemic stroke. *Neuro Sci* 2007; 28:165-167.

Marini C, Totaro R, Carolei A. Long-term prognosis of cerebral ischemia in young adults. National Research Council Study on Group on Stroke in the Young. *Stroke* 1999; 30:2320-2325.

Massaro AR. Stroke in Brazil: A South America perspective. *Int J Stroke* 2006; 1:113-115.

McIlroy SP, Dynan KB, Lawson JT, Patterson CC, Passmore AP. Moderately elevated plasma homocysteine, methylenetetrahydrofolate reductase genotype, and risk for Stroke, Vascular Dementia, and Alzheimer disease in Northern Ireland. *Stroke* 2002; 33:2351-2356.

Miller LG, Fahey JM. Interleukin-1 modulates GABAergic and glutamatergic function in brain. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 739:292-298.

Miller LG, Galpern WR, Dunlap K, Dinarello CA, Turner TJ. Interleukin-1 augments gamma-aminobutyric acidA receptor function in brain. *Mol Pharmacol* 1991; 39:105-108.

Montaner J, Alvarez-Sabin J, Molina C, Anglés A, Abilleira S, Arenillas J, González MA, Monasterio J. Matrix metalloproteinase expression after human cardioembolic stroke- Temporal profile and relation to neurological impairment. *Stroke* 2001a; 32:1759-1766.

Montaner J, Alvarez-Sabín J, Molina CA, Anglés A, Abilleira S, Arenillas J, Monasterio J. Matrix metalloproteinase expression is related to hemorrhagic transformation after stroke. *Stroke* 2001b; 32:2762-2767.

Montaner J, Fernandes-Cadenas I, Molina CA, Ribo M, Huertas R, Roseli A, et al. Poststroke C-reactive protein is an powerful prognostic tool among candidates for thrombolysis. *Stroke* 2006; 37:1205-1210.

Morancho A, Rosell A, Garcia-Bonilla L, Montaner J. Metalloproteinase and stroke infarct size: role for anti-inflammatory treatment?. *AnnNYAcadSci* 2010; 1207:123-133.

Morita A, Nakayama T, Soma M. Association between C-reactive protein genes and ischemic stroke in Japanese subjects. *Am J Hyperten* 2006; 19:593-600.

Murakami Y, Saito K, Hara A, Zhu Y, Sudo K, Niwa M, Fujii H, Wada H, Ishiguro H, Mori H, Seishima M. Increases in tumor necrosis factor-alpha following transient global cerebral ischemia do not contribute to neuron death in mouse hippocampus. *J Neurochem* 2005; 93: 1616-1622.

Naoum JJ, Chal H, Lin PH, Lumsden AB, Yao Q, Chen C. Lymphotoxin- α and cardiovascular disease: clinical association and pathogenic mechanisms. *Med Sci Monit* 2006; 12: RA121-124.

NIND. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. *N Eng J Med* 2005; 333:1581-1587.

Oh MS, Yu KH, Chu MK, Ma HI, Kim YJ, Kim JY, Lee BC, Mi SO, Kyung-Ho Y, Min-Kyung C, Hyeo-II M, Yun JK, Joo YK, Byung-Chul L. Long-term prognosis of symptomatic isolated middle cerebral artery disease in Korean stroke patients. *BMC Neurology* 2011; 11:138.

Offner H, Subramanian S, Parker SM, Afentolis ME, Vandenbark AA, Hurn PD. Experimental stroke induces massive, rapid activation of the peripheral immune system. *J Cereb Bloo Flow Metab* 2006; 26: 654-665.

Oliveira-Filho J, Martins SC, Pontes-Neto OM, Longo A, Evaristo EF, Carvalho JJ, Fernandes JG, Zétola VF, Gagliardi RJ, Vedolin L, Freitas GR; Executive Committee from Brazilian Stroke Society and the Scientific Department in Cerebrovascular

Diseases. Guidelines for acute ischemic stroke treatment: part I. *Arq Neuro-Psiquiatr* 2012; 70: 621-629.

Pang L, Ye W, Che XM, Roessler BJ, Betz AL, Yang GY. Reduction of inflammatory response in the mouse brain with adenoviral-mediated transforming growth factor- β 1 expression. *Stroke* 2001; 32:544-552.

Parreira J de S, Kallaur AP, Lehmann MF, Oliveira SR, Frizon DA, Delongui F, de Araújo MC, Rossato C, de Almeida JT, Pelegrino LM, Bragato EF, Morimoto HK, Simão AN, Kaimen-Maciel DR, Reiche EM. Tumor necrosis factor beta Ncol polymorphism (rs909253) is associated with inflammatory and metabolic markers in acute ischemic stroke. *Metab Brain Dis* 2015; 30:159-167.

Pena SD, Di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, Genro JP, Hutz MH, Kehdy Fde S, Kohlrausch F, Magno LA, Montenegro RC, Moraes MO, de Moraes ME, de Moraes MR, Ojopi EB, Perini JA, Racciopi C, Ribeiro-Dos-Santos AK, Rios-Santos F, Romano-Silva MA, Sortica VA, Suarez-Kurtz G. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PLoS One* 2011; 6: e17063.

Pober JS, Lapierre LA, Stolpen AH, Brock TA, Springer TA, Fiers W, et al. Activation of cultured human endothelial cells by recombinant lymphotoxin: comparison with tumor necrosis factor and interleukin 1 species. *J Immunol* 1987; 138:3319-3324.

Prentice RL, Szatrowski TP, Kato H, Mason MW. Leukocyte counts and cerebrovascular disease. *J Chron Dis* 1982; 35:703-14.

Rallidis LS, Vikelis M, Panagiotakos DB, Rizos I, Zolindaki MG, Kaliva K, Kremastinos DT. Inflammatory markers and in-hospital mortality in acute ischemic stroke. *Atherosclerosis* 2006; 189: 193-197.

Ramos Fernandes M, Bellolio F, Stead LG. Matrix Metalloproteinase-9 as a marker for acute ischemic stroke: a systematic review. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases* 2011; 20: 47-54.

Reiche EMV, Nunes SOV, Morimoto HK. Stress, depression, the immune system, and cancer. *Lancet Oncol* 2004; 5:617-625.

Ridcker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH. Inflammation, aspirin, and risks of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N Engl J Med* 1997; 336:973-979.

Rodrigues-Yanes M, Castellanos M, Blanco M, Garcia MM, Nombela F, et al. New-onset hypertension and inflammatory response/poor outcome in acute ischemic stroke. *Neurology* 2006; 67:1973-1978.

Rohr J, Kittner S, Feaser B, Hebel JR, Whyte MG, Weinstein A, et al. Traditional risk factors and ischemic stroke in young adults. The Baltimore-Washington Cooperative Young Stroke Study. *Arch Neurol* 1996; 53:603-607.

Romanic AM, White RF, Arleth AJ, Ohlstein EH, Barone FC. Matrix metalloproteinase expression increases after cerebral focal ischemia in rats. Inhibition of matrix metalloproteinase-9 reduces infarct size. *Stroke* 1998; 29:1020-1030.

Rosamond W, Flegal K, Furie K, Go A, Greenlund K, Haase N et al. Heart disease and stroke statistics: 2008 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 2008; 117:e25-146.

Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115-126.

Rost NS, Wolf PA, Kase CS, Kelly-Hayes M, Silbershatz H, Massaro JM, D'Agostino RB, Franzblau C, Wilson PW. Plasma concentration of C-reactive protein and risk of ischemic stroke and transient ischemic attack: the Framingham study. *Stroke* 2001; 32:2575–2579.

Ruehl ML, Orozco JA, Stoker MB, McDonagh PF, Coull BM, Ritter LS. Protective effects of inhibiting both blood and vascular selectins after stroke and reperfusion. *Neurol Res* 2002; 24:226-232.

Sharma S, Sharma A, Kumar S, Sharma SK, Gosh B. Association of TNF haplotypes with asthma, serum IgE levels, and correlation with serum TNF-alpha levels. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006; 35: 488-495.

Shichita T, Sakaguchi R, Suzuki M, Yoshimura A. Post-ischemic inflammation in the brain. *Front Immunol* 2012; 3:132.

Shinozaki K, Naritomi H, Shimizu T, Suzuki M, Ikebuchi M, Sawada T, Harano Y. Role of insulin resistance associated with compensatory hiperinsulinemia in ischemic stroke. *Stroke* 1996; 27:37-43.

Smith CJ, Emsley HC, Gavin CM, Georgiou RF, Vail A, Barberan EM, Del Zoppo GJ, Hallenbeck JM, Rothwell NJ, Hopkins SJ, Tyrrell PJ. Peak plasma interleukin-6 and other peripheral markers of inflammation in the first week of ischemic stroke correlate with brain infarct volume, stroke severity and long-term outcome. *BMC Neurology* 2004; 4:2.

The Emerging Risk Factors Collaboration, Kaptoge S, Di Angelantonio E, Lowe G, Pepys MB, Thompson SG, Collins R, Danesh J. C-reactive protein concentration and risk of coronary heart disease, stroke, and mortality: an individual participant meta-analysis. The Emerging Risk Factors Collaboration Group. *The Lancet* 2010; 375:132-140.

Tuttolomondo A, Raimondo DD, Pecoraro R, Serio A, D'Aguanno G, Pinto A, Licata G. Immune-inflammatory markers and arterial stiffness indexes in subjects with acute ischemic stroke. *Atherosclerosis* 2010; 213:311-318.



Tuttolomondo A, Di Raimondo D, Pecoraro R, Arnao V, Pinto A, Licata G. Inflammation in ischemic stroke subtypes. *Curr Pharm Des* 2012; 18:4289-4310.

- van Exel E, Gussekloo J, de Craen AJ, Bootsma-van der Wiel A, Frölich M, Westendorp RG. Inflammation and stroke: the Leiden 85-Plus Study. *Stroke* 2002; 33:1135-1138.
- Vila N, Castillo J, Dávalos A, Chamorro A. Proinflammatory cytokines and early neurological worsening in ischemic stroke. *Stroke* 2000; 31:2325-2329.
- Wang X, Yue TL, Barone FC, White RF, Gagnon RC, Feuerstein GZ. Concomitant cortical expression of TNF-alpha and IL-1 beta mRNAs follows early response gene expression in transient focal ischemia. *Mol Chem Neuropathol* 1994; 23:103-114.
- Wang Q, Tang XN, Yenari MA: The inflammatory response in stroke. *J Neuroimmunol* 2007; 184:53-68.
- Wang Q, Ding H, Tang J-R, Zhang L, Xu Y-J, Yan J-T, Wang W, Hui R-T, Wang C-Y, Wang D-W. C-reactive protein polymorphisms and genetic susceptibility to ischemic stroke and hemorrhagic stroke in the Chinese Han population. *Acta Pharmacol Sin* 2009b; 30: 291-298.
- Waterer GW, Wunderink RG. Science review: Genetic variability in the systematic inflammatory response. *Critical Care* 2003; 7: 308-314.
- Wilson PW. Metabolic risk factors for coronary heart disease: current and future prospects. *Curr Opin Cardiol* 1999; 14:176-185.
- Wood PL. Microglia as a unique cellular target in the treatment of stroke: potential neurotoxic mediators produced by activated microglia. *Neurol Res* 1995; 17:242-248.
- Wu TH, Chien KL, Lin HJ, Hsu HC, Su TC, Chen MF, Lee YT. Total white blood cell count or neutrophil count predict ischemic stroke events among adult Taiwanese: report from a community-based cohort study. *BMC Neurol* 2013; 13:7.
- Yach D, Hawkes C, Gould CL, Hoffman KJ. The global burden of chronic diseases: overcoming impediments to prevention and control. *JAMA* 2004; 291:2616-2622.
- Yaranov DM, Smyrlis A, Usatii N, Butler A, Petrini JR, Mendez J, Warshofsky MK. Effect of obstructive sleep apnea on frequency of stroke in patients with atrial fibrillation. *Am J Cardiol* 2015; 115: 461-465.
- Yrjänheikki J, Keinänen R, Pellikka M, Hökfelt T, Koistinaho J. Tetracyclines inhibit microglial activation and are neuroprotective in global brain ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:15769-15774.
- Zhao Bi-Q, Tejima E, Lo EH. Neurovascular Proteases in Brain Injury, Hemorrhage and remodeling after stroke. *Stroke* 2007; 38: 748-52.

ANEXOS

ANEXO 1A

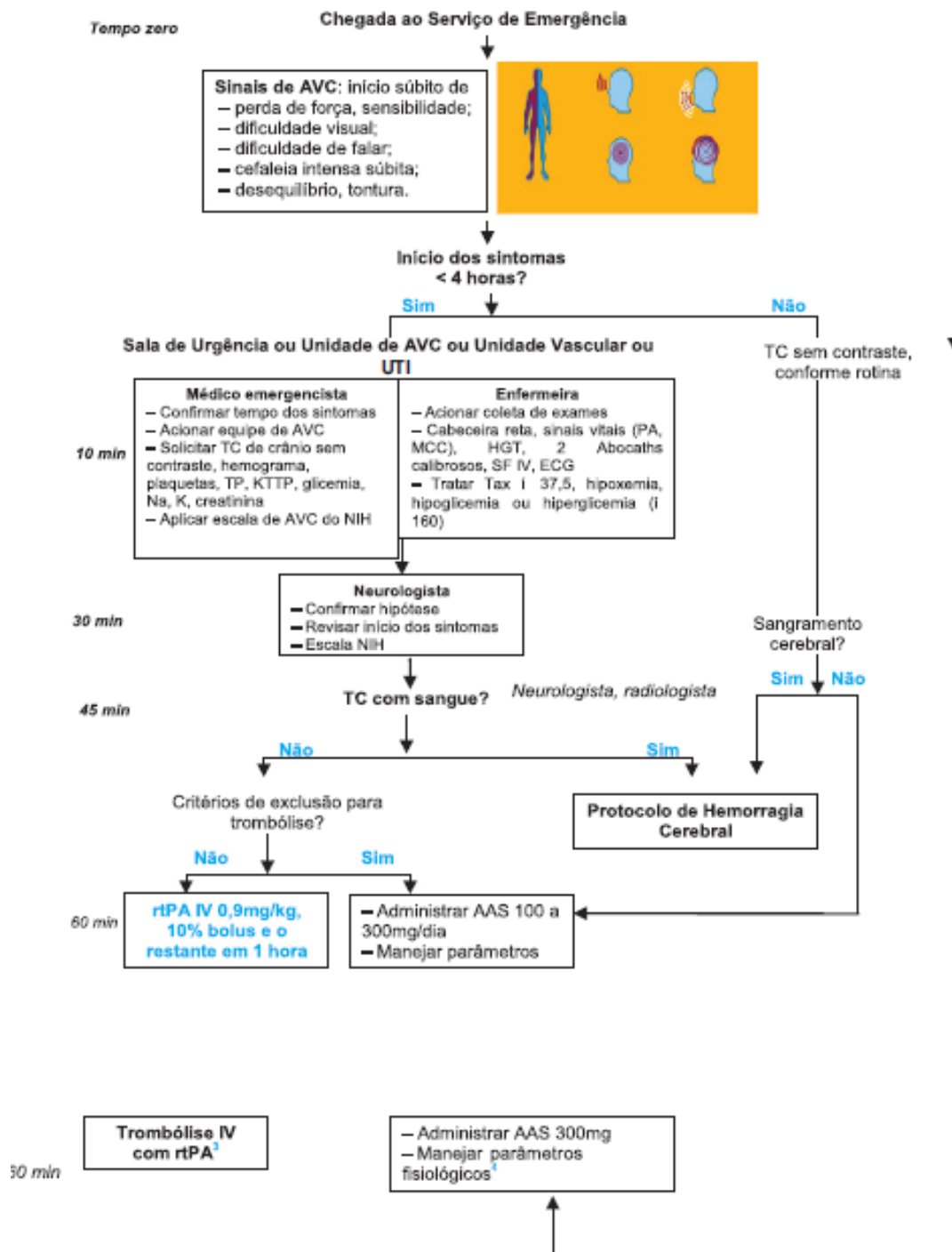
PROTOCOLO DE ATENDIMENTO PRÉ-HOSPITALAR DE PACIENTES COM ACIDENTE VASCULAR
CEREBRAL

PROTOCOLO DE ATENDIMENTO PRÉ-HOSPITALAR ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL		
Regulação Médica – AVC com menos de 4,5 horas de evolução		
QUADRO CLÍNICO		
<input type="checkbox"/> Fraqueza ou dormência súbitas em um lado do corpo <input type="checkbox"/> Confusão, dificuldade pra falar ou entender de início súbito. <input type="checkbox"/> Dificuldade súbita para enxergar com um ou ambos os olhos. <input type="checkbox"/> Dificuldade súbita para andar, tontura ou incoordenação de início súbito. <input type="checkbox"/> Cefaléia intensa e súbita sem causa aparente. <input type="checkbox"/> Outros sintomas neurológicos focais agudos sugestivos de AVC _____		
Data início dos sintomas:	Hora do início dos sintomas:	
Acordou com sintomas <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO	Última vez em que foi visto sem sintomas:	
AVC Hiperagudo? <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO		
Regulação Médica Local		
CINCINATTI		
1) Dê um sorriso  <input type="checkbox"/> Normal <input type="checkbox"/> Alterado	2) Levante os Braços  <input type="checkbox"/> Normal <input type="checkbox"/> Alterado	3) Fale a frase: O Brasil é o país do futebol. <input type="checkbox"/> Normal <input type="checkbox"/> Alterado
Alertas de possível exclusão para AVC HIPERAGUDO : <input type="checkbox"/> Glicemia < 50 mg/dL <input type="checkbox"/> Crise convulsiva <input type="checkbox"/> Síndrome demencial <input type="checkbox"/> Previamente acamado		
Contra-indicações possíveis para trombólise: <input type="checkbox"/> Trauma craniano importante recente <input type="checkbox"/> Cirurgia extensa recente <input type="checkbox"/> Hemorragia recente _____ <input type="checkbox"/> AVC hemorrágico prévio		
Fatores de risco cerebrovascular conhecidos: <input type="checkbox"/> HAS <input type="checkbox"/> DM <input type="checkbox"/> Tabagismo <input type="checkbox"/> Dislipidemia <input type="checkbox"/> AVC/AIT prévio <input type="checkbox"/> Fibrilação atrial <input type="checkbox"/> IAM prévio		
SINAIS VITAIS		
PA _____ mmHg	FC _____	FR _____ Sat. O2 _____ % HGT _____ Glasgow _____
CONDUTA		
<input type="checkbox"/> Oximetria <input type="checkbox"/> Oxigênio máscara se SaO ₂ < 92% <input type="checkbox"/> Ventilação ambu máscara <input type="checkbox"/> Intubação <input type="checkbox"/> Acesso venoso <input type="checkbox"/> SF 0,9% <input type="checkbox"/> Não reduzir PA <input type="checkbox"/> Monitorização Cardíaca <input type="checkbox"/> Cabeceira reta <input type="checkbox"/> Hora de início dos sintomas <input type="checkbox"/> Outro _____		
REMOÇÃO		
<input type="checkbox"/> Hospital1 <input type="checkbox"/> Hospital2 <input type="checkbox"/> Hospital3 <input type="checkbox"/> Outro _____ <input type="checkbox"/> Contato no destino <input type="checkbox"/> Hora da chegada no destino _____		
Assinatura _____		Data _____

Fonte: BRASIL. Manual de Rotinas para atendimento ao AVC. Editora Ministério da Saúde. Brasília; Ministério da Saúde (2013).

ANEXO 1B

FLUXOGRAMA DE ATENDIMENTO DO ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL AGUDO



Fonte: BRASIL. Manual de Rotinas para atendimento ao AVC. Editora Ministério da Saúde. Brasília; Ministério da Saúde (2013).

ANEXO 2

APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS DA UEL


Andamento do projeto - CAAE - 0176.0.268.000-10				
Título do Projeto de Pesquisa				
Resposta inflamatória e imunológica nos pacientes com acidente vascular cerebral e sua correlação com o prognóstico clínico				
Situação	Data Inicial no CEP	Data Final no CEP	Data Inicial na CONEP	Data Final na CONEP
Aprovado no CEP	03/09/2010 16:37:59	18/05/2011 23:42:46		
Descrição	Data	Documento	Nº do Doc	Origem
1 - Envio da Folha de Rosto pela Internet	02/09/2010 12:37:09	Folha de Rosto	FR368784	Pesquisador
2 - Recebimento de Protocolo pelo CEP (Check-List)	03/09/2010 16:37:59	Folha de Rosto	0176.0.268.000-10	CEP
3 - Protocolo Aprovado no CEP	18/05/2011 23:42:46	Folha de Rosto	181/2010	CEP



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS
Universidade Estadual de Londrina
Registro CONEP 268

Parecer CEP/UEL:	294/2011
CAAE:	0250.0.268.000-11
Processo:	29144.2011.42
Folha de Rosto:	462193
Pesquisador(a):	Edna Maria Vissoci Reiche
Unidade/Órgão:	CCS - Departamento Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas
<p>Prezado(a) Senhor(a):</p> <p>O "Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina" (Registro CONEP 268) – de acordo com as orientações da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS e Resoluções Complementares, avaliou o projeto:</p> <p>"BIOMARCADORES GENÉTICOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO NO ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO: estudo da relevância clínica e da influência no prognóstico dos pacientes"</p>	
<p>Situação do Projeto: APROVADO</p> <p>Informamos que deverá ser comunicada, por escrito, qualquer modificação que ocorra no desenvolvimento da pesquisa, bem como deverá apresentar ao CEP/UEL relatório final da pesquisa.</p>	
<p>Londrina, 20 de dezembro de 2011.</p> <p></p> <p>Prof. Dra. Alexandrina Aparecida Maciel Cardelli Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos Universidade Estadual de Londrina</p>	

ANEXO 3A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA GRUPO DE PACIENTES COM AVC

“RESPOSTA INFLAMATÓRIA E IMUNOLÓGICA NOS PACIENTES COM ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL ISQUÊMICO AGUDO E SUA RELAÇÃO COM O DEFICIT NEUROLÓGICO E EVOLUÇÃO CLÍNICA”

Prezado (a) Senhor (a):

Gostaríamos de convidá-lo a participar da pesquisa **“RESPOSTA INFLAMATÓRIA E IMUNOLÓGICA NOS PACIENTES COM ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL ISQUÊMICO AGUDO E SUA RELAÇÃO COM O DEFICIT NEUROLÓGICO E EVOLUÇÃO CLÍNICA”**, realizada no Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina. O objetivo da pesquisa é saber se existe algum exame de sangue que possa indicar de forma mais rápida e simples sinais de que um acidente vascular cerebral (AVC ou derrame no cérebro) tem maiores riscos de evoluir de maneira desfavorável. A sua participação é muito importante e ela se daria da seguinte forma: **coleta de amostra de sangue (20 ml) no dia de sua entrada no hospital e após três meses da alta hospitalar, na época do atendimento ambulatorial para avaliação do quadro clínico**. Gostaríamos de esclarecer que sua participação é totalmente voluntária, podendo você: recusar-se a participar, ou mesmo desistir a qualquer momento sem que isto acarrete qualquer ônus ou prejuízo à sua pessoa. Informamos ainda que as informações serão utilizadas somente para os fins desta pesquisa e serão tratadas com o mais absoluto sigilo e confidencialidade, de modo a preservar a sua identidade.

Solicitamos ainda sua autorização para que após o término do presente estudo, o material de sangue coletado possa ser armazenado, identificado de maneira sigilosa sob a responsabilidade da equipe de pesquisadores, para ser utilizada em futuros estudos sobre os fatores de risco associados ao acidente vascular cerebral a serem desenvolvidos por esta mesma equipe de pesquisadores. Caso não autorize, informamos que o material coletado para este estudo, será descartado após o término da presente pesquisa.

Os benefícios esperados são que caso a hipótese da pesquisa seja confirmada, estes resultados poderão agilizar e facilitar os tratamentos disponíveis

para um derrame. O sangue que será coletado para a pesquisa será parte da mesma coleta de exames de rotina que será realizada independentemente de sua participação ou não no estudo e desta forma, não vos acarreta em nenhum risco adicional.

Informamos que o senhor não pagará nem será remunerado por sua participação. Garantimos, no entanto, que todas as despesas decorrentes da pesquisa serão ressarcidas, quando devidas e decorrentes especificamente de sua participação na pesquisa.

Caso você tenha dúvidas ou necessite de maiores esclarecimentos pode contatar o médico **Dr. Márcio Francisco Lehmann, pelo telefone 43 - 9928 5518, ou e-mail mflehmann@hotmail.com ou procurá-lo no Hospital Universitário de Londrina, na Av. Robert Koch 60, 3371-2000, Setor de Neurologia**), ou procurar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, na Avenida Robert Koch, nº 60, ou no telefone 3371-2490. Este termo deverá ser preenchido em duas vias de igual teor, sendo uma delas, devidamente preenchida e assinada entregue a você.

Londrina, ____ de _____ de 20 ____.

**Pesquisador Responsável: Dr. Márcio Francisco Lehmann, médico,
CRM/PR 16.049. RG 4.481.314-9 SSP/PR, fone: 43 - 9928 5518,
e-mail: mflehmann@hotmail.com**

_____ (nome por extenso do sujeito de pesquisa), tendo sido devidamente esclarecido sobre os procedimentos da pesquisa, concordo em participar **voluntariamente** da pesquisa descrita acima.

Assinatura (ou impressão dactiloscópica): _____

Data: _____

Assinatura do responsável (ou impressão dactiloscópica):

Data: _____

Obs: Caso o participante da pesquisa seja menor de idade, deve ser incluído o campo para assinatura do menor e do responsável.

ANEXO 3B

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA GRUPO DE CONTROLES

“RESPOSTA INFLAMATÓRIA E IMUNOLÓGICA NOS PACIENTES COM ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL ISQUÊMICO AGUDO E SUA RELAÇÃO COM O DEFICIT NEUROLÓGICO E EVOLUÇÃO CLÍNICA”

Prezado (a) Senhor (a):

Gostaríamos de convidá-lo a participar da pesquisa: **“RESPOSTA INFLAMATÓRIA E IMUNOLÓGICA NOS PACIENTES COM ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL ISQUÊMICO AGUDO E SUA RELAÇÃO COM O DEFICIT NEUROLÓGICO E EVOLUÇÃO CLÍNICA”**, realizada no Hospital Universitário de Londrina. O objetivo da pesquisa é saber se existe algum exame de sangue que possa indicar de forma mais rápida e simples sinais de que um acidente vascular cerebral (AVC ou derrame no cérebro) tem maiores riscos de evoluir de maneira desfavorável. A sua participação é muito importante e ela se daria da seguinte forma: coleta de amostra de sangue (20 ml) no dia de sua entrada no hospital. Gostaríamos de esclarecer que sua participação é totalmente voluntária, podendo você: recusar-se a participar, ou mesmo desistir a qualquer momento sem que isto acarrete qualquer ônus ou prejuízo à sua pessoa. Informamos ainda que as informações serão utilizadas somente para os fins desta pesquisa e serão tratadas com o mais absoluto sigilo e confidencialidade, de modo a preservar a sua identidade.

Solicitamos ainda sua autorização para que após o término do presente estudo, o material de sangue coletado possa ser armazenado, identificado de maneira sigilosa sob a responsabilidade da equipe de pesquisadores, para ser utilizada em futuros estudos sobre os fatores de risco associados ao acidente vascular cerebral a serem desenvolvidos por esta mesma equipe de pesquisadores. Caso não autorize, informamos que o material coletado para este estudo, será descartado após o término da presente pesquisa.

Os benefícios esperados são que caso a hipótese da pesquisa seja confirmada, estes resultados poderão agilizar e facilitar os tratamentos disponíveis para um derrame. O sangue que será coletado para a pesquisa será parte da mesma coleta de exames de rotina que será realizada independentemente de sua participação ou não no estudo e desta forma, não vos acarreta em nenhum risco adicional.

Informamos que o senhor não pagará nem será remunerado por sua participação. Garantimos, no entanto, que todas as despesas decorrentes da pesquisa serão ressarcidas, quando devidas e decorrentes especificamente de sua participação na pesquisa.

Caso você tenha dúvidas ou necessite de maiores esclarecimentos pode nos contatar **Dr. Márcio Francisco Lehmann, Av. Robert Koch 60, 3371-2000**, ou procurar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, na Avenida Robert Koch, nº 60, ou no telefone 3371-2490. Este termo deverá ser preenchido em duas vias de igual teor, sendo uma delas, devidamente preenchida e assinada entregue a você.

Londrina, ___ de _____ de 20__.

**Pesquisador Responsável: Dr. Márcio Francisco Lehmann, médico,
CRM/PR 16.049. RG 4.481.314-9 SSP/PR.**

_____ (**nome por extenso do sujeito de pesquisa**), tendo sido devidamente esclarecido sobre os procedimentos da pesquisa, concordo em participar **voluntariamente** da pesquisa descrita acima.

Assinatura (ou impressão dactiloscópica): _____

Data: _____

Obs: Caso o participante da pesquisa seja menor de idade, deve ser incluído o campo para assinatura do menor e do responsável.

ANEXO 4

QUESTIONÁRIO PARA COLETA DE DADOS PACIENTES E CONTROLES

**RESPOSTA INFLAMATORIA E IMUNOLÓGICA NOS PACIENTES COM
ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL E SUA CORRELAÇÃO COM O
PROGNÓSTICO CLÍNICO.**

Projeto de Pesquisa aprovado pelo CEP/UEL, Protocolo 19382/10,
CAE 0176.0.268.000-10

Data ___/___/___/

Número no projeto: _____

IDENTIFICAÇÃO

Nome:

Idade: _____ anos

Sexo : () M () F

Antecedentes Mórbidos Pessoais: () HAS () DM () AVC
 () Dislipidemia () Sedentarismo () IAM
 () Dça Autoimune () Dça Hematológica
 () Dça Infecciosa () Outro:

Medicamentos de uso contínuo:

() Uso de antioxidantes

() Uso de vitaminas

() Outros

Antecedentes Mórbidos Familiares: () HAS () DM () Dislipidemia

() AVC () IAM () Outro: _____

Condições e hábitos de vida: () Tabagismo () Etilismo () Sedentarismo

Historia Clínica e Exame Físico da Entrada (*baseline*):

Peso (Kg) _____ Altura (m)

Pressão arterial (mmHg) _____ Circunferência abdominal
(cm) _____

Atividade física:

() SIM () 1x semana () 2x semana () 3x semana () > 3 x
semana
() NÃO

Escala de Rankin Modificada

0- Nenhum sintoma

1- Não apresenta incapacidade significativa, apenas sintomas; capaz de realizar as obrigações e atividades habituais

2- Leve incapacidade; incapaz de realizar todas as atividades prévias, porém capaz de realizar os cuidados consigo próprio sem assistência.

3- Moderada incapacidade; necessita alguma ajuda, consegue andar sem ajuda

4- Moderada /ou severa incapacidade; incapaz de andar sem assistência e não consegue realizar sozinho os cuidados consigo próprio

5- Incapacidade grave; acamado e sob cuidados constantes de enfermagem, incontinente.

6- Morte

TOTAL (0-6): _____