



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

JAIR ROBERTO GELINSKI

**MARCADORES INFLAMATÓRIOS E METABÓLICOS COMO
PREDITORES DE MORTE EM PACIENTES COM ACIDENTE
VASCULAR ENCEFÁLICO ISQUÊMICO AGUDO**

Londrina
2018

JAIR ROBERTO GELINSKI

**MARCADORES INFLAMATÓRIOS E METABÓLICOS COMO
PREDITORES DE MORTE EM PACIENTES COM ACIDENTE
VASCULAR ENCEFÁLICO ISQUÊMICO AGUDO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Elaine Regina Delicato de Almeida

Coorientadora: Profa. Dra. Edna Maria Vissoci Reiche.

Londrina
2018

JAIR ROBERTO GELINSKI

**MARCADORES INFLAMATÓRIOS E METABÓLICOS COMO
PREDITORES DE MORTE EM PACIENTES COM ACIDENTE
VASCULAR ENCEFÁLICO ISQUÊMICO AGUDO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra Elaine Regina Delicato
de Almeida
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. José Wander Breganó
Universidade Estadual de Londrina UEL

Prof. Dr. Marcell Alysson BatistiLozovoy
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 22 de março de 2018.

AGRADECIMENTOS

A Deus, único capaz de nossa criação e sabedoria.

À minha esposa Joana, pela paciência que tem comigo.

Aos meus filhos (Matheus e João) e filhas (Sarah, Fernanda, Rafaela e Valentina).

À minha orientadora Professora Dra. Elaine Regina Delicato de Almeida pela confiança, calma, paciência e dedicação neste tempo de curso.

À professora Dra. Edna Maria Vissoci Reiche, pela coorientação e suporte fortíssimo para levar este trabalho até o final.

À Daniela Frizon Alfieri, uma pessoa incrível que Deus colocou no meu caminho.

Aos colegas de trabalho do setor de Histocompatibilidade e Criopreservação Celular do Hospital Universitário de Londrina/ UEL.

Ao Corpo Docente que participou da minha grade curricular do curso de mestrado.

Aos pacientes e seus familiares.

GELINSKI, Jair Roberto. **Marcadores inflamatórios e metabólicos como preditores de morte em pacientes com acidente vascular encefálico isquêmico agudo.** 2018. 89 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

RESUMO

Introdução: Acidente vascular encefálico isquêmico (AVEI) é uma das principais causas de morte e incapacidade em todo o mundo. Mecanismos inflamatórios e metabólicos têm um papel importante no risco do AVE e são associados a um pior prognóstico. Níveis circulantes elevados de marcadores inflamatórios após o AVEI estão associados a mortalidade. Atualmente, o diagnóstico precoce do AVEI depende de exames clínicos e de neuroimagem, por isso é muito importante encontrar um biomarcador que identifique o AVEI agudo e estabeleça procedimentos de diagnósticos precoces e risco de morte a curto e longo prazo. Para o AVEI ainda não existe um biomarcador ideal. **Objetivo:** Esse trabalho teve como objetivo principal identificar os melhores preditores de morte em pacientes com AVEI agudo. **Material e métodos:** Foi realizado um estudo observacional, prospectivo, longitudinal e de seguimento. Um total de 176 controles e 145 pacientes com AVEI foram analisados. Do total de pacientes: 91 sobreviveram e 54 não sobreviveram. Foram coletados fatores de risco associados ao AVEI, dados demográficos, antropométricos e clínicos. Amostras de sangue foram coletadas em até 24 horas após o diagnóstico de AVEI. A Escala de Rankin Modificada (mRS) foi avaliada até 8 horas do AVEI (momento da admissão) e após três meses de evolução. Os marcadores inflamatórios e metabólicos analisados foram: níveis séricos de proteína C reativa ultrasensível (usPCR), interleucina 6 (IL-6), ferritina, velocidade de hemossedimentação (VHS), leucócitos periféricos, 25-hidroxivitamina D [25(OH)D], ferro sérico, proteína sérica total, glicose, insulina, lipoproteína de alta densidade (HDL colesterol) e níveis plasmáticos de hidroperóxidos lipídicos. Esses biomarcadores foram categorizados como índice inflamatório 1 e 2 (todos expressos em Z scores). O índice inflamatório 1 foi considerado como: usPCR, IL-6, ferritina, VHS e leucócitos periféricos. O índice inflamatório 2 foi considerado como: índice inflamatório 1 menos [25(OH)D, ferro e proteínas totais]. **Resultados:** Os resultados mostraram que os pacientes não sobreviventes eram mais velhos e apresentaram um maior déficit neurológico (mRS) avaliado no momento da admissão comparados aos que sobreviveram. Os pacientes não sobreviventes apresentaram significativamente maiores níveis basais de IL-6, usPCR, ferritina e glicose; e menores níveis de HDL-colesterol e 25 (OH) D do que os sobreviventes. Os não sobreviventes apresentaram significativamente maior VHS e menores níveis séricos de proteínas totais do que os controles, enquanto os sobreviventes ocuparam uma posição intermediária. As análises de regressão binária nos pacientes não sobreviventes mostraram que os níveis de IL-6, glicose, ferritina, CL-LOOH e 25 (OH) D predizeram significativamente a morte em pacientes com AVEI. O melhor preditor foi IL-6 seguido dos níveis de glicose. Além disso, o índice inflamatório 1 e o mRS predizeram significativamente a morte em pacientes com AVEI. Nas análises da curva ROC com todos os biomarcadores como variáveis discriminatórias, o índice inflamatório 1 e 2 mostraram os melhores desempenhos de diagnóstico para prever morte após AVEI, com uma AUC igual a 0,870 e 0,851, respectivamente. A usPCR (AUC=0,776) e IL-6

(AUC=0,775) mostraram resultados satisfatórios com uma sensibilidade de 48,6% e especificidade de 89,3% para usPCR > 13,5 mg/L; e uma sensibilidade de 51,4% e especificidade de 84,6 % para IL-6 > 20,4 pg/mL. **Conclusão:** Nossos resultados demonstraram que a ativação das vias inflamatórias e metabólicas está associada com altas taxas de mortalidade após AVEI. Esses dados poderiam ajudar no desenvolvimento de novas ferramentas de biomarcadores, que prevêm a morte pós-AVEI, e demonstraram que as vias de sinalização da IL-6, juntamente com os desequilíbrios redox, poderiam ser novos alvos de drogas na prevenção da morte após o AVEI.

Palavras-chave: Acidente vascular encefálico. Inflamação. Biomarcadores. Proteína c-reativa.

GELINSKI, Jair Roberto. **Prediction of death following acute ischemic stroke by immune-inflammatory and metabolic biomarkers**. 2018. 89 p. Dissertation (Master's Degree in Program in Clinical and Laboratory Physiopathology) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

ABSTRACT

Introduction: Ischemic stroke is a major cause of death and long-term adult disability worldwide. Inflammatory and metabolic mechanisms play an important role in the risk of stroke and are associated with a worse prognosis. Elevated circulating levels of inflammatory markers after stroke are associated mortality. At present, the diagnosis of AVEI depends on clinical examination and neuro-imaging techniques, so it is very important to identify a biomarker that identifies acute AVEI and establish procedures for early diagnosis and risk of death in the short and long term. There is still no ideal biomarker for AVEI. **Objective:** The main objective of this study was to identify the best predictors for stroke death in acute ischemic stroke (AIS) patients. **Material and methods:** An observational, prospective, longitudinal and follow-up study was performed. A total of 176 controls subjects and 145 patients with AIS were enrolled. Of the total patients: 91 survived and 54 did not survive. Stroke risk factors, demographic, anthropometric, and clinical data, as well as blood samples were obtained up to 24 hours of stroke. The modified Rankin Scale (mRS) was applied up to eight hours of AIS (baseline mRS) and after three-month follow-up. The immune-inflammatory and metabolic biomarkers were C-reactive protein assayed with high sensitivity method (hsCRP), interleukin (IL)-6, ferritin, erythrocyte sedimentation rate (ESR), peripheral leukocytes, 25 hydroxvitamin D [25(OH) vitD], iron, total 14serum protein (TSP), glucose, insulin, high-density lipoprotein cholesterol (HDL) and lipid hydroperoxides (CL-COOH). These biomarkers were categorized as INFLAM index 1 and 2 (all expressed in Z scores). INFLAM index 1 was computed as: hsCRP, IL-6, ferritin, ESR and peripheral leukocytes. INFLAM index 2 was computed as: INFLAM 1 – [25(OH)D + iron + TSP]. **Results:** The results showed that patients who died after stroke were significantly older and presented the mRS neurological deficit score at the admission (baseline mRS) was higher than patients who survived. Non-survivors showed higher baseline levels of IL-6, hsCRP, ferritin and glucose and lower levels of HDL-cholesterol and 25(OH)D than survivors. Non-survivors showed higher ESR and lowered TSP than controls, while survivors occupied an intermediate position. Binary regression analysis showed that death after AIS is best predicted by increased IL-6, glucose, ferritin and CL-LOOH and lowered 25(OH) levels. The best predictor was IL-6 followed by glucose. Moreover, zINFLAM index 1 together with baseline mRS significantly predicted stroke death *versus* survivors. In the ROC curve analyses with all biomarkers as discriminatory variables, zINFLAM index 1 e zINFLAM index 2 showed the best diagnostic performance with an AUC equaling 0.870 and 0.851, respectively. The hsCRP (AUC=0.776) and IL-6 (AUC=0.775) showed satisfactory results with a 48.6% sensitivity and 89.3% specificity for hsCRP > 13.5 mg/L and a 51.4% sensitivity and 84.6% specificity for IL-6 > 20.4 pg/mL. **Conclusion:** Our results underscored the activation immune-inflammatory and metabolic pathways is associated with high mortality rates after AIS. These data may help to develop new biomarker tools, which predict post-stroke death, and show that IL-6 trans-signaling coupled with redox imbalances could be new drug targets in the prevention of death after AIS.

Keywords: Ischemic stroke. Inflammation. Serum biomarkers. C-reactive protein.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1a, 1b:	AVE isquêmico e hemorrágico	16
Figura 2:	Atividades biológicas da Interleucina-6	25
Figura 3:	Instauração do processo aterosclerótico.....	30

LISTA DE TABELA

TABELA 1: Classificação de categorias segundo <i>TrialofOrg 10172 in AcuteStrokeTreatment</i> (TOAST).....	17
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIT	Ataque Isquêmico Transitório
AVC	Acidente Vascular Cerebral
AVE	Acidente Vascular Encefálico
AVEH	Acidente Vascular Encefálico Hemorrágico
AVEI	Acidente Vascular Encefálico isquêmico
CD8	Cluster of differentiation 8
CD40	Cluster of differentiation 40
CD80	Cluster of differentiation 80
CD86	Cluster of differentiation 86
CE	Doença Cardíaca Emboligênica
CEI	Infarto Cardioembólico
DM	Diabetes Mellitus
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
DNCT	Doenças Crônicas Não Transmissíveis
ERO	Espécie Reativa de Oxigênio
GLM	Modelo de análise linear geral
GLP-1	<i>Glucagon-like peptide-1</i>
HBV	Vírus da Hepatite B
HCV	Vírus da Hepatite C
HDL-C	<i>High-Density Lipoprotein Cholesterol</i> - Lipoproteína de Alta Densidade
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HTLV	Vírus Linfotrópico de Células T Humanas
HU	Hidroxiuréia
HU/UEL	Hospital Universitário/ Universidade Estadual de Londrina
IC	Intervalo de Confiança
ICAM-1	Molécula de Adesão Inter Celular-1
IL-1	Inerleucina 1
IL-1 β	Interleucina 1 Beta
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5

IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IMC	Índice de Massa Corpórea
IgE	Imunoglobulina E
INF- γ	Interferon gama
kDa	Kilodalton
LAAS	<i>Large Artery Atherosclerosis</i> - Aterosclerose de Grandes Artérias
LAC	<i>Lacunar infarct</i> - Infarto lacunar
LAC	Laboratório de Análises Clínicas
LAD	Doença de Vaso Grande e Ateroma Sem Estenose
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
LDL-C	<i>Low-Density Lipoprotein Cholesterol</i> - Lipoproteína de Baixa Densidade
MCP-1	Proteína Quimiotática de Monócitos 1
MMP	<i>Matrix Metallo Proteinase</i> - Metaloproteinases de Matriz
mRS	<i>Modified Rankin Scale</i> - Escala de Rankin Modificada
NIHSS	National Institute of Health Stroke Scale
NK	Natural Killer
ODE	<i>Other Determined Etiology</i> - AVE de outra Etiologia Determinada
OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	<i>Oddsratio</i> – Razão de Chances
PAD	Pressão Sanguínea Diastólica
PAS	Pressão Sanguínea Sistólica
PCR	Proteína C Reativa
PDGF	Fatores Derivados de Plaquetas
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
ROS	Espécie Reativa de Oxigênio
SAMU	Serviço de Atendimento Móvel de Urgência
SNC	Sistema Nervoso Central
TC	Tomografia Computadorizada
T _H 2	T <i>helper</i> 2
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i> -Fator de Necrose Tumoral Alfa

TOAST	<i>Trial of Org in 10172 Acute Stroke</i>
UDE	<i>Undetermined Etiology</i> - AVE com Etiologia Indeterminada
VCAM-1	Molécula de Adesão Vascular-1
VHS	Velocidade de Hemossedimentação
VLDL	<i>Very Low-Density Lipoprotein</i> - Lipoproteína de Muito Baixa Densidade
VDR	Receptor de Vitamina D

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	AVEI e Inflamação	20
1.2	AVEI e Marcadores Inflamatórios	22
1.2.1	Proteínas de fase aguda positivas	22
1.2.2	Interleucina - 6 (IL-6)	24
1.3	AVEI e Marcador Anti-inflamatório	25
1.3.1	Vitamina D	25
1.4	AVEI e Marcadores Metabólicos	28
1.4.1	Glicose, insulina e HDL colesterol	28
1.4.2	Ferritina e ferro	31
1.5	Tratamento do AVE	31
2	JUSTIFICATIVA	33
3	OBJETIVOS	34
3.1	Objetivo Geral	34
3.2	Objetivos Específicos	34
4	MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1	Delineamento	35
4.2	Participantes	35
4.3	Amostra e coleta de dados	35
4.4	Critérios de Exclusão	37
4.5	Exames Laboratoriais	37
4.5.1	Marcadores inflamatórios	38
4.5.2	Marcadores anti-inflamatórios	39
4.5.3	Marcadores metabólicos	39
4.6	Análise Estatística	39
5	RESULTADOS	41
5.1	Artigo	42
6	CONCLUSÕES	74
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	75

REFERÊNCIAS	76
ANEXO 1 - APROVAÇÃO PELO COMITE DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS DA UEL	82
ANEXO 2A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA GRUPO DE PACIENTES COM AVC.....	83
ANEXO 2B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA GRUPO DE CONTROLES	85
ANEXO 3 - QUESTIONÁRIO PARA COLETA DE DADOS PACIENTES E CONTROLES.....	87
ANEXO 4 - E-MAIL DE SUBMISSÃO DO ARTIGO À REVISTA.....	89

1 INTRODUÇÃO

Acidente Vascular Encefálico (AVE) é definido como uma perda súbita da função cerebral devido a uma interrupção do fluxo sanguíneo em uma determinada região encefálica, levando a um déficit neurológico (BRASIL, 2013).

AVE é umas das maiores causas de mortalidade no mundo, uma das principais causas de internações e a maior causa de incapacitação da população 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 (ABRAMCZUK; VILLELA, 2009; GILES; ROTHWELL, 2008; PEREIRA et al., 2009).

Nosso país vem seguindo uma tendência já observada nos países desenvolvidos de queda nas taxas de mortalidade, mas mesmo assim, o AVE representa a primeira causa de morte e incapacidade no país, o que cria grande impacto econômico e social. Dados provenientes de estudos prospectivos no Brasil indicaram incidência anual de 108 casos por 100 mil habitantes, taxa de fatalidade aos 30 dias de 18,5% e aos 12 meses de 30,9%, sendo o índice de recorrência após um ano de 15,9% (ABRAMCZUK; VILLELA, 2009; BRASIL, 2016).

O AVE gera despesas por causa do grande número de mortes prematuras, morbidade em muitos sobreviventes, atenção aos cuidados para as famílias ou prestadores de assistência e afeta os serviços de saúde. A Organização Mundial da Saúde (OMS) define o AVE como comprometimento neurológico focal (ou às vezes global), de ocorrência súbita e duração de mais de 24 horas (ou que causa morte) e provável origem vascular. Compreende um comprometimento neurológico, início súbito, duração de mais de 24 horas e possível origem vascular. A definição exclui ataque isquêmico transitório (AIT), que é definido como sintomas neurológicos focais mas com duração inferior a 24 horas, hemorragia subdural, hemorragia epidural, intoxicação e sintomas causados por traumatismo (WHO, 2009).

A incidência de AVE em homens corresponde 33% a mais do que em mulheres em 19 países em 5 continentes diferentes. Observou-se que mulheres aparecem com a doença 4,3 anos depois que os homens. Estes índices de prevalência foram ajustados à idade, significando que o AVE foi prevalente 41% a mais nos homens em relação às mulheres. O fato das mulheres possuírem menos incidentes dessa natureza talvez esteja nos fatores genéticos, na presença do hormônio estrogênio, na circulação cerebral ou na pressão arterial. Este último é

mais elevado em homens de idade semelhante às mulheres (APPELROS; STEGMAYR; TERÉNT, 2009).

Há dois principais tipos de AVE: o isquêmico (AVEI) que ocorre quando um vaso sanguíneo que irriga determinada região encefálica sofre oclusão (Figura 1a) e o hemorrágico (AVEH) quando o vaso sofre uma ruptura (Figura 1b). As principais causas relacionadas às hemorragias intracerebrais espontânea e subaracnóidea são, respectivamente, a hipertensão arterial sistêmica, os aneurismas e malformações arteriovenosas cerebrais (BENJAMIN et al., 2017). O AVEH pode levar à morte imediatamente após o evento enquanto o AVEI raramente leva ao óbito nas primeiras horas, sendo o mais freqüente e correspondem a 85% dos casos.

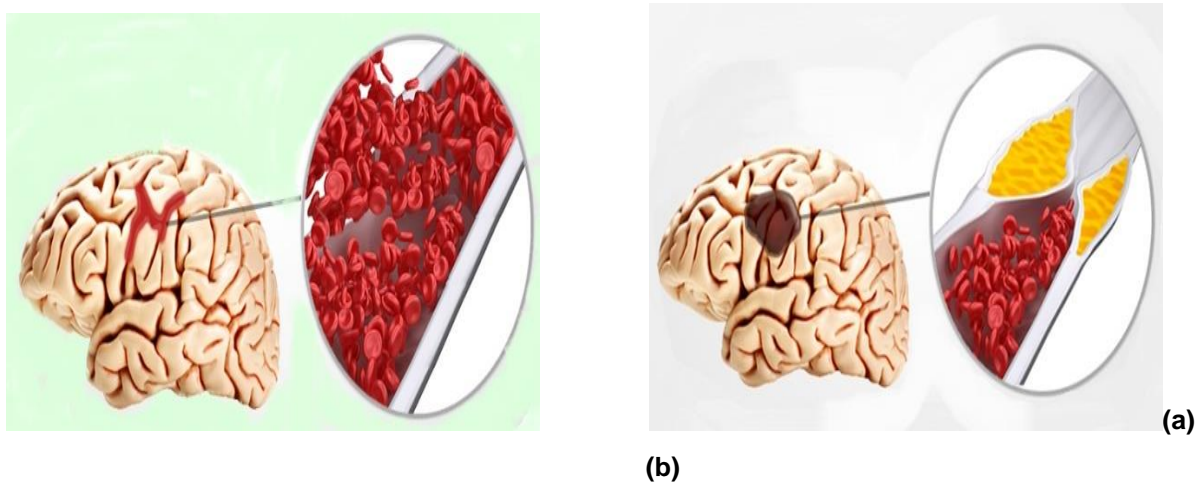


Figura 1a -AVE Isquêmico: o fluxo sanguíneo é interrompido devido a um oclusão parcial ou total de um vaso por trombo ou êmbolo, privando o tecido cerebral de oxigênio.

Figura 1b - AVE Hemorrágico: ruptura espontânea de um vaso, com sangramento para o interior do cérebro, para o sistema ventricular e/ou para o espaço subaracnóideo.

Fonte: <http://saudeexperts.com.br/avc-acidente-vascular-cerebral>, acesso em 28.12.2017

A classificação do AVEI 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; CHUNG, 2014), 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, mostrados na tabela 1.

Classificação de categorias (TOAST)	
Aterosclerose de grandes artérias (<i>large artery atherosclerosis, LAAS</i>)	Caracterizada por estenose (>50%) ou oclusão de uma artéria cerebral maior ou de um ramo cortical, presumivelmente, causada pela aterosclerose
Infartos cardioembólicos (<i>cardio embolic infarct, CEI</i>)	Caracterizado por oclusões causadas por êmbolos provenientes do coração
Infartos lacunares (<i>lacunar infarct, LAC</i>)	Oclusão de pequeno vaso, identificado em pacientes diabéticos e hipertensos clinicamente, síndromes lacunares, apresentando exames de imagem como: tomografia computadorizada (TC) ou ressonância magnética nuclear (RMN) normais ou com lesões relevantes subcorticais hemisféricas ou no tronco cerebral com diâmetro menor que 1,5 cm
AVE com outra etiologia determinada (<i>stroke of other determined etiology, ODE</i>)	Engloba pacientes com causas raras de AVE, como as vasculopatias não ateroscleróticas, estados de hipercoagulação ou desordens hematológicas. Os pacientes devem ter achados clínicos e TC ou RMN de AVEI agudo independentes do tamanho ou localização
AVC com etiologia indeterminada (<i>stroke of undetermined etiology, UDE</i>)	A causa do AVEI não pode ser determinada em várias situações, com algum grau de confiabilidade, a despeito de extensiva investigação

Tabela1: Classificação de categorias segundo *TrialofOrg 10172 in Acute Stroke Treatment (TOAST)*.

O AVEI 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 AVEI é a do *National Institute of Health Stroke Scale (NIHSS)* que quantifica o déficit neurológico logo após o evento isquêmico. Nesta classificação, os pacientes são pontuados de zero (sem déficit) a 42 (maior déficit) (BROTT; ADAMS; OLINGER, 1989).

A avaliação do estado de incapacidade funcional após três, seis ou doze meses do evento isquêmico pode ser expressa pelo Índice de Rankin Modificado (mRS). Descreve seis graus de incapacidade após um acidente vascular cerebral:

grau zero denota nenhum sintoma ou sequela, grau 5 denota incapacidade grave, acamados e 6 indica óbito decorrente do evento isquêmico (BONITA, BEAGLEHOLE, 1988). O mRSé a escala mais popular de desfechos globais em AVE, e vem sendo cada vez mais adotada com objetivos primários de ensaios clínicos em AVEI agudo.

Número de óbitos por AVEI diminuíram, mas a incidência da doença e sequelas aumentam há três décadas. Indivíduos com AVE possuem uma porção maior de AVEI comparado com AVEH, e o infarto lacunar é o tipo mais comum de AVE. Acredita-se que isto ocorra devido alta prevalência de doença microvascular e pré-existência de hipertensão, comum neste grupo de pacientes (BENJAMIN et al., 2017)

Os principais fatores de risco do AVE dividem-se em três grupos (BRASIL, 2016):

1) Grupo de risco não modificável: idosos, sexo masculino, baixo peso ao nascimento, negros (por associação com hipertensão arterial maligna), história familiar de ocorrência de AVE, história progressiva de Acidente Isquêmico Transitório (AIT), condições genéticas como anemia falciforme;

2) Grupo de risco modificável: hipertensão arterial sistêmica, tabagismo, diabetes mellitus (DM), dislipidemia, fibrilação atrial, outras doenças cardiovasculares;

3) Grupo de risco potencial: sedentarismo, obesidade, uso de contraceptivo oral, terapia de reposição hormonal pós-menopausa, etilismo, aumento da homocisteína plasmática, síndrome metabólica por aumento da gordura abdominal, uso de cocaína e anfetaminas.

As pessoas que pertencem ao grupo de riscos modificáveis precisam de incentivo para que elas consigam mudança no estilo de vida, e aquelas que pertencem ao grupo de risco potencial, o desafio é não permitir que estes se tornem um risco efetivo (BRASIL, 2016).

O diagnóstico da doença deve ser considerado quando o paciente apresentar início súbito de déficit neurológico focal ou alteração do nível de consciência. Equipes de emergência devem reconhecer sinais e sintomas comuns no AIT e no AVE. Observar sinais da circulação carotídea (anterior) como: paralisia unilateral, dormência, distúrbio de linguagem, distúrbios visuais, cegueira monocular. Em relação à circulação vértebro-basilar (posterior) observar: vertigem, distúrbio visual, diplopia, paralisia, dormência, disartria, ataxia (AMERICAN HEART

ASSOCIATION, 1997).O AVEI caracteriza por fraqueza de um lado do corpo, dificuldade na linguagem, diminuição ou perda da visão e perda da sensibilidade de um lado do corpo.O tipo hemorrágico mostra indícios como alteração motora, paralisia de um lado do corpo, dificuldade na fala, distúrbio sensitivo, alteração no nível de consciência.

Atualmente o diagnóstico é realizado por meio de exames de imagens como a TC e RMN.Dados do Ministério da Saúde indicam que cerca de 68 mil mortes acontecem no Brasil anualmente. É a primeira causa de morte e incapacidade, gerando prejuízo econômico e social. Em atendimento das urgências do AVE, foi elaborado “A Linha de Cuidado do AVE”, um programa do governo federal, que visa o tratamento imediato do paciente, que pode ser salvo em local preparado para dar o atendimento. Inclui a rede básica de saúde, Serviço de Atendimento Móvel de Urgência (SAMU), unidades hospitalares de emergência, reabilitação ambulatorial e atenção domiciliar. O idoso pode apresentar AVE por mais de uma vez, podendo ter problemas de memória devido à somatória de lesões no cérebro. Fatores de risco vasculares devem ser controlados. Dentre eles a pressão arterial, DM, dislipidemias, doenças cardíacas prévias, tabagismo, alimentação e hábitos de exercícios físicos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Em 2005, dos 58 milhões de óbitos no mundo, 35 milhões tiveram como causa as doenças crônicas não transmissíveis (DCNT). As doenças relacionadas ao sistema circulatório são a principal causa de óbito (30% de todos os casos). Nesse período no Brasil, as doenças circulatórias representaram a terceira causa de internação hospitalar no sistema público de saúde. Muito dos recursos da saúde foram utilizados para tratamento de doenças cardíacas, AVE e diabetes, estimando um custo de 27 bilhões de dólares. Países desenvolvidos reduzem em até 4% a mortalidade por doenças ateroscleróticas intervindo na prevenção primária e secundária da doença. Além disso, o investimento no uso de drogas trombolíticas e de novas drogas antitrombóticas, como também na anticoagulação de pacientes com fibrilação atrial crônica, implantação de unidades de atendimento de AVE e a endarterectomia carotídea, podem reduzir em até 80% a incidência de AVE (MURRAY; LOPES, 1997; WALD; LAW, 2003).

O Brasil vem apresentando avanços consideráveis no atendimento aos pacientes com AVE; todavia, ainda é necessária melhoria das condições socioeconômicas, educativas, controle primário e secundário dos fatores de risco,

prevenção da doença aterosclerótica e na qualidade do atendimento hospitalar, principalmente quando falamos em serviços públicos de saúde (BOTELHO et al., 2016; CABRAL, 2009).

Mecanismos inflamatórios e metabólicos têm um papel importante no risco do AVE e são associados a um pior prognóstico. Níveis circulantes elevados de marcadores inflamatórios após o AVEI estão associados a mortalidade a curto prazo (LIMA et al., 2015; RODRIGUES; SANTANA; GALVÃO, 2017; WHITELEY et al., 2009).

Um biomarcador ideal deve ser confiável, rápido, sensível, específico e disponível. Pode auxiliar no diagnóstico e no monitoramento do tratamento de doenças. Para o AVEI ainda não existe um biomarcador ideal. É possível agrupar diferentes biomarcadores para prever uma doença ou seu prognóstico. Entre as diferentes moléculas da resposta inflamatória avaliada como biomarcadores, a Interleucina -6 (IL-6) tem exercido um papel importante no AVEI (BACKES, 2015). O desafio dos biomarcadores é a comprovação de sua validade clínica e analítica, utilidade clínica através de estudos prospectivos, estudos comparativos entre biomarcadores, resultados semelhantes sem exames invasivos e caros (TAVARES, 2016).

1.1 AVEI e Inflamação

Existem evidências que a inflamação tem um papel importante na fisiopatologia do AVEI. Uma das causas mais frequentes de AVEI é a aterosclerose, considerada uma doença inflamatória crônica. A reação inflamatória induzida pelos fatores de risco e a resposta imunológica associada são os principais acontecimentos que favorecem o processo de aterosclerose (CHAMORO, 2004; ROSS, 1999).

Microglia é uma célula residente no sistema nervoso central (SNC). Essas células regulam a homeostase no SNC e desempenham uma variedade de papéis na lesão neuronal. As micróglia esvaziam detritos e reparam os tecidos danificados durante as respostas inflamatórias primárias, mas podem também promover danos após a inflamação. Micróglia reativas são produtoras de mediadores pró-inflamatórios, como: Fator de Necrose Tumoral Alfa ($TNF\alpha$) e Interleucina 1-beta ($IL-1\beta$) após AVE, contribuindo para o aumento da degradação e permeabilidade

neurovascular, por ativar fatores derivados de plaquetas e aumentar a expressão de metaloproteinases (MMPs) como MMP-9, durante os estágios iniciais do acidente vascular cerebral (RAYASAM, 2018).

Estudos têm demonstrado que AVE gera resposta inflamatória. Quando em excesso, parece ser responsável pelas sequelas neurológicas. Também há evidência da supressão do sistema imunitário em resposta à lesão cerebral, predispondo os doentes às infecções bacterianas. Quando ocorre rompimento de vaso, diminui o aporte sanguíneo provocando falhas nos canais iônicos, acúmulo de sódio e cálcio intracelular, perda da integridade das membranas, morte celular imediata e localizada. Os efeitos da hipóxia e diminuição do aporte de glicose levam a um aumento da produção de espécies reativas do oxigênio (ERO) e a disfunção mitocondrial, ativando as vias de necrose e de apoptose dos neurônios (PARMAR, 2016).

As lesões isquêmicas cerebrais estão associadas com a indução de uma resposta inflamatória caracterizada por ativação e liberação de proteínas de fase aguda como proteína C-reativa (PCR) e citocinas. A maioria das reações inflamatórias é mediada por citocinas que podem potencializar a lesão cerebral isquêmica alterando os mecanismos de regulação de moléculas de adesão, recrutamento e ativação de leucócitos (FASSBENDER et al., 1994).

Os neutrófilos são os primeiros leucócitos recrutados para o cérebro isquêmico e podem potencializar a lesão diretamente secretando substâncias deletérias. Uma alteração laboratorial frequentemente associada ao AVEI é a leucocitose com neutrofilia, e a diminuição do número de neutrófilos foi associada com melhora do curso clínico do evento isquêmico (WANG; TANG; YENARI, 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 AVEI recorrente (GRAW et al., 2004). Após os neutrófilos, ocorre uma invasão de monócitos/macrófagos que atingem um pico cerca de uma semana após a isquemia e contribuem para a fisiopatologia do estágio subagudo após o AVEI (GARCIA; KAMIJYO, 1974).

Resposta inflamatória forte e persistente está associada com piores resultados (HUANG et al., 2012).

1.2 AVEI e Marcadores Inflamatórios

A inflamação é um dos fatores mais importantes na origem do AVEI, especialmente na fase aguda, embora outros fatores estejam envolvidos. Age como o elemento patológico chave da progressão do AVEI. 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 AVEI. Vários biomarcadores têm sido associados com o volume final do infarto, alguns desses sendo marcadores moleculares de inflamação (CASTELLANOS et al., 2002).

O bloqueio da cascata inflamatória parece diminuir o dano cerebral em modelos experimentais de AVEI (HAN; YENARI, 2003). Sendo assim, o estudo de marcadores inflamatórios e metabólicos nesses pacientes é extremamente relevante, como: PCR avaliada por método ultrassensível (usPCR), proteínas séricas totais, IL-6, ferro sérico, ferritina, leucócitos, VHS, vitamina D, insulina, glicose, HDL colesterol.

1.2.1 Proteínas de fase aguda positivas

A PCR é uma proteína de fase aguda sintetizada pelo fígado em resposta à infecção ou processo inflamatório agudo. Trata-se de uma proteína não específica da resposta imune inata. Dentre os biomarcadores inflamatórios usados, a usPCR continua sendo uma das mais requisitadas no AVEI. Esta proteína é associada com desenvolvimento de aterosclerose, sendo essa a principal causa do AVEI. A usPCR é um preditor de eventos vasculares em indivíduos aparentemente saudáveis (YU et al., 2016).

Atualmente, o diagnóstico precoce do AVEI depende de exames clínicos e de neuroimagem, por isso é muito importante encontrar um biomarcador que identifique o AVEI agudo e estabeleça procedimentos de diagnósticos precoces. Estudos têm encontrado associação dessa proteína com o AVEI em relação aos seguintes fatores: diagnóstico precoce, subtipos de AVEI, prognóstico, risco de morte a curto e longo prazo (YU et al., 2016).

Entretanto, os valores dessa proteína podem ser influenciados por polimorfismos genéticos (HUANG et al., 2012), raça, sexo, índice de massa corpórea (IMC) (YU et.al., 2016; CORREIA et al., 2010) e ambiente. Esses fatores podem contribuir para resultados controversos entre os estudos que avaliam essa proteína em situações de saúde e doença (YU et.al., 2016).

A expressão da usPCR apresenta boa resposta à inflamação e tem sido estudada exaustivamente como um biomarcador em doenças cardiovasculares e AVEI. Em indivíduos aparentemente saudáveis o aumento dessa proteína tem sido associado como preditor de um futuro evento cardiovascular. Também está envolvida na recaída de algumas doenças, como: Doença Cardíaca Coronariana, Doença Arterial Periférica, Doenças da Aorta (HUANG et al., 2012). É uma proteína plasmática de fase aguda produzida principalmente pelos hepatócitos, pertencente da família das pentraxinas. Existem numerosas evidências de sua participação na aterogênese tais como: aumento da expressão de Molécula de Adesão Vascular (VCAM), Molécula de Adesão Inter Celular-1 (ICAM-1), E-selectina, Proteína Quimiotática de Monócitos (MCP-1), aumento na migração de células musculares lisas, promoção da disfunção endotelial *in vivo* (MINAME; SANTOS, 2009).

VanGilder e colaboradores (2014) avaliaram vários estudos que relacionavam os níveis de PCR em pacientes pós AVEI e o estado funcional desses pacientes em longo prazo. Os níveis dessa proteína foram avaliados dentro das 24 horas do início dos sintomas e os resultados indicaram uma significativa associação entre níveis elevados de PCR com estado funcional desfavorável em longo prazo.

Em outro estudo realizado em 455 pacientes idosos, Strandberg e Tilvis (2000) analisam os níveis de PCR em pacientes divididos em três coortes (75, 80 e 85 anos de idade). Os resultados mostraram que os valores dessa proteína estavam associados com os fatores de risco cardiovasculares nestes pacientes. Entretanto, os resultados mostraram que os níveis de PCR predizem mortalidade nos pacientes idosos, mas que essa associação foi significativa apenas no coorte de 75 anos. Essa diferença pode ser em parte devido aos medicamentos anti-inflamatórios utilizados, principalmente, na população de mais idade, como aspirina e estatinas.

Outra proteína de fase aguda associada ao AVEI é o fibrinogênio. O aumento desta proteína após o AVEI está associado ao aumento na mortalidade. O 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 (DI NAPOLI et al., 2005).

A hiperfibrinogenemia no AVEI agudo está associado ao aumento de risco de morte um ano após acontecimento do AVE e baixa funcionalidade dessa proteína. Níveis elevados de fibrinogênio (e também PCR) podem ser reflexo da carga de aterosclerose no início do AVE, aumentando seus valores durante a fase aguda (SWAROWSKA et. al., 2014).

1.2.2 Interleucina - 6 (IL-6)

A IL-6 é uma citocina pró-inflamatória de 26 kDA secretada pelas células fagocíticas, endoteliais e T ativadas do tipo T_H2. Seu papel no sistema imune é estimular o fígado a produzir proteínas de fase aguda positivas como fatores do sistema complemento, da coagulação e PCR. A IL-6 estimula a proliferação e diferenciação de linfócitos B em resposta fisiológica não maligna. Neste último caso exerce efeito sobre a troca de classe da IgG (PEAKMAN; VERGANI, 1999). IL-6 está envolvida na regulação da apoptose de neurônios e sua regulação é aumentada após a isquemia cerebral (HERRMANN et al., 2003) (Figura 2).

VILA e colaboradores (2000) analisaram os níveis de IL-6 em 231 pacientes com AVEI agudo e verificaram que a deterioração neuronal precoce está associada com altas concentrações dessa citocina no plasma e líquido cefalorraquidiano (LCR) desses pacientes (VILA et al., 2000).

A IL-6 e a PCR estão fortemente associadas à inflamação, e ambas têm sido intensivamente estudadas em pacientes com AVEI; entretanto, em um estudo realizado com 203 pacientes após AVEI, a elevação dos níveis de IL-6 foi o marcador inflamatório que mostrou o maior valor preditivo independente associado com a morte hospitalar (RALLIDIS et al., 2006). Altos níveis de fibrinogênio e IL-6 são em longo prazo preditores de mortalidades independentes em pacientes que sobreviveram de AVEI (FROYSHOV et al., 2017).

Lehmann (2015) descreveu que a IL-6 foi o único marcador que se mostrou aumentado nos pacientes com AVEI tanto nos pacientes com leve quanto nos com moderado/grave déficit neurológico, avaliada pela mRS, quando comparada aos controles, sendo também significativamente mais elevada nos pacientes com moderado/grave déficit neurológico quando comparados aos com leve déficit

neurológico.

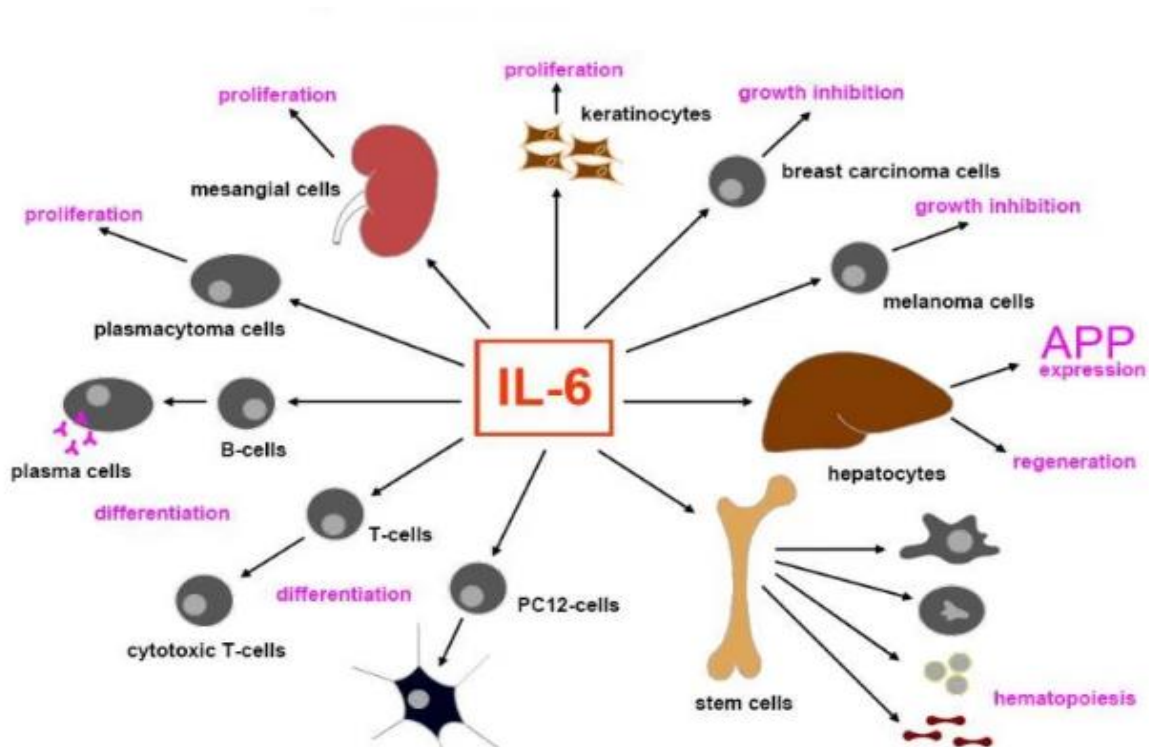


Figura 2: Atividades biológicas da Interleucina-6 (COHEN, 2017).

1.3 AVEI e Marcador Anti-inflamatório

1.3.1 Vitamina D

A vitamina D (colecalférol) é um hormônio esteroide com função de regulação da homeostase do cálcio, formação e reabsorção óssea, na interação com as paratireoides, rins e intestinos. A dieta representa 20% da fonte de vitamina D, enquanto a principal fonte está nos tecidos cutâneos após exposição aos raios ultravioleta B solar. No sangue a vitamina D circula ligada principalmente a uma proteína ligadora de vitamina D, e uma pequena fração permanece ligada à albumina. Sofre hidroxilação no fígado, mediada por uma enzima citocromo P450-like, e é convertida em 25-hidroxivitamina D [25(OH)D], a forma circulante em maior quantidade, porém biologicamente inerte. A etapa final da produção do hormônio é a hidroxilação adicional nas células do túbulo contorcido proximal no rim, originando a 1,25 desidroxivitamina D [1,25(OH)₂D₃], sua forma biologicamente ativa (MARQUES et al., 2010).

A forma ativa da vitamina D atravessa a membrana celular, entra na célula alvo e se liga ao receptor de vitamina D (VDR) que está presente no citoplasma. Os

VDR estão presentes em células do tipo hematopoiéticas, linfócitos, epidérmicas, pancreáticas, miócitos, neuronais, cardiomiócitos, células do músculo liso vascular, endoteliais, placentárias, osteoblastos, osteoclastos, epiteliais do intestino delgado e tubulares renais (HOLICK, 2007).

A vitamina 25(OH)D é o principal metabólito circulante da vitamina D e é um indicador do *status* dessa vitamina no indivíduo (SMOLDERS et al., 2008).

O princípio do uso terapêutico da vitamina D foi para tratamento do raquitismo em crianças, através de óleo de fígado de bacalhau. Em 1827 Trousseau associou a cura na associação do óleo com a exposição solar. Em 1925 foi identificado as duas formas nutricionais da vitamina D, sendo vitamina D3 (colecalciferol) e vitamina D2 (ergocalciferol) (SOUSA, 2016).

Deficiência de vitamina D está associada a fatores de risco para AVE e serve como um marcador de diagnóstico para AVEI, como hipertensão arterial, trombose, aterosclerose e inflamação. Esta vitamina é um tratamento efetivo para evitar desenvolvimento de doenças musculoesqueléticas (BRONDUM-JACOBSEN et al., 2013).

Na formação de osso a vitamina D inibe síntese de colágeno tipo 1; induz síntese de osteocalcina; promove diferenciação, *in vitro*, de precursores celulares monócitos-macrófagos em osteoclastos, estimula a produção do ligante RANK (RANK-L), que resulta em um efeito que facilita a maturação dos precursores de osteoclastos para osteoclastos (MARQUES et al., 2010).

A saúde óssea é um problema importante devido ao alto risco de metástases ósseas e ao uso prolongado freqüente de terapias hormonais que alteram o turnover fisiológico do osso, levando ao aumento do risco de fratura. Pacientes com risco de osteoporose e fraturas devido tratamento de câncer podem ser prevenidos com suplemento de cálcio e vitamina D. Mulheres pré-menopáusicas submetidas a supressão ovariana recomenda-se suplementação de cálcio e vitamina D (HANDFORTH et al., 2017).

A vitamina D tem mostrado evidências em sua atuação no sistema imune. Mediada pelo VDR, a vitamina D atua na proliferação e diferenciação celular e imunomodulação. A maioria das células imunológica expressa VDR, mas a maior concentração está em células imaturas no timo e linfócitos CD8 maduros. Células apresentadoras de antígeno (macrófagos, monócitos, células dendríticas) apresentam efeitos mediados pela vitamina D como: inibição das moléculas de

expressão MHC classe II; inibição da expressão das moléculas co-estimulantes CD40, CD80, CD86 e proteínas indutoras de maturação (CD1a, CD83); aumento quimiotático e fagocítico de monócitos e citotoxicidade contra células tumorais e bactérias; inibição da liberação de IL-12 P70; inibição de IL-1 e TNF por macrófagos e monócitos. A ação da vitamina D sobre linfócitos T inibe proliferação de linfócitos T e secreção de citocinas; aumento da produção de IL-4, IL-5 e IL-10; inibição de IL-12, INF- γ e IL-2. Nas células B a vitamina D tem efeito sobre a expressão do VDR; supressão da excreção de IgE. Nos linfócitos NK a vitamina D inibe INF- γ (MARQUES et al. 2010).

A Vitamina D possuium efeito imunomodulador por causar redução da expressão de citocinas pro-inflamatórias, indução a apoptose de linfócitos T ativados inibição da proliferação de linfócitos T e B (SMOLDERS et al., 2008).

Os valores de referência da vitamina D apontam se há suficiência, insuficiência ou deficiência do hormônio. Existem dois critérios atuais. Pelo comitê do Instituto de Medicina dos Estados Unidos, valores inferiores a 20ng/ml indicam deficiência da vitamina D; 10ng/ml como deficiência grave; 10-19ng/ml insuficiência. Pela Endocrine Society, também nos Estados Unidos, a deficiência de vitamina D possui valores inferiores a 20ng/ml; insuficiência entre 20-30ng/mL; suficiência com valores acima de 30ng/mL (URRUTIA-PEREIRA; SOLÉ, 2015).

Em idosos que sofreram AVEI é comum níveis diminuídos de vitamina D e também é um preditor da gravidade na admissão e no desfecho funcional precário nesses pacientes (DAUBAIL et al., 2013).

Alfieri et al. (2016) avaliaram a relação entre os níveis séricos de 25(OH)D e AVEI. Em relação aos controles, os pacientes com AVEI apresentaram menores níveis deste micronutriente e pacientes com deficiência da vitamina D demonstraram 18,4 vezes mais chance para a ocorrência de AVEI comparados aos com suficiência desta vitamina. Além disto, pacientes com deficiência de vitamina D mostraram níveis mais elevados de usPCR do que os com suficiência de vitamina e os níveis de 25(OH)D foram negativamente correlacionados com o deficit neurológico (mRS) após três meses de seguimento. Após três meses do AVEI, os pacientes com baixos níveis de vitamina D apresentaram pior prognóstico para a doença, sugerindo um importante papel de esta vitamina na resposta inflamatória e patofisiológica do evento isquêmico (ALFIERI et al., 2016).

1.4 AVEI e Marcadores Metabólicos

1.4.1 Glicose, insulina e HDL colesterol

Dentre os fatores de risco modificáveis do AVEI estão a lesão aterosclerótica, diabetes, hipertensão, tabagismo e dislipidemia. A principal causa de AVEI é a aterosclerose, sendo essa uma doença inflamatória crônica na qual os mecanismos imunes podem interagir com fatores de risco como DM e assim iniciar, ativar e propagar desordens vasculares nesses pacientes. O DM é uma doença comum com alta prevalência no mundo todo. DM tipo 2 ocasiona embolismo e trombose extra-crânio, carótida intracranio e sistemas artéria-vertebral. Na presença de tabagismo, etilismo, dislipidemia, hemoglobina glicada elevada e idade avançada, o DM tem significativa influênciana na ocorrência do AVEI (NATUVA et al., 2016).

Segundo às categorias clínicas da *American Diabetes Association*, DM pode ser classificado em diferentes tipo 1 (pela destruição das células β do pâncreas); tipo 2, devido a um defeito da secreção da insulina; outros tipos específicos de diabetes devido a outras causas, como defeitos genéticos na função das células β , defeitos genéticos na ação da insulina, doenças do pâncreas exócrino como fibrose cística, indução química ou drogas; e DM gestacional (*American Diabetes Association*, 2014).

Dentro das doenças cardiovasculares, o AVEI é uma complicação que apresenta mortalidade e morbidade aumentadas em pacientes com DM de até quatro vezes. Normalmente acompanham obesidade, dislipidemia e hipertensão, que somam aos fatores de risco para AVEI. A prevalência global do DM tipo 2, em 2015, era estimada em 415 milhões de adultos. A OMS estima que existem 900 milhões de pessoas acima de 60 anos e que deverá atravessar 2 bilhões até 2050. Já o DM tipo 1 aumenta o fator de risco para AVEI em menor escala. (*AMERICAN DAIBETES ASSOCIATION*, 2014).

Resistência à insulina tem um papel importante nas doenças cardiovasculares. Com o aparecimento de novas drogas antidiabéticas para o DM tipo 2, o uso de antigos hipoglicemiantes como a insulina e sulfonilureias são menos indicadas pelos médicos. Metformina e a pioglitazona fornecem benefício cerebrovascular na população resistente à insulina. Análogos de *glucagon-like peptide-1* (GLP-1) demonstram sua eficácia em resultados cardiovasculares,

juntamente com a redução do peso e da pressão arterial. O uso de empagliflozina mostrou resultados melhores nos pacientes com doenças renais, demonstrando ser melhor indicado para pacientes com doenças cardiovasculares com DM tipo 2 e com nefropatia diabética. Melhora da função renal foi obtida com uso de empagliflozina, demonstrada recentemente que pode ser indicada em pacientes cardiovasculares com DM tipo 2, na nefropatia diabética (TUN et al., 2017).

Assim como a hiperinsulinemia e hiperglicemia, a resistência à insulina é fator de risco independente para o AVEI. Em indivíduos com DM tipo 1, é mais comum a disfunção diastólica cardíaca que a sistólica. Também é alto o risco da disfunção diastólica em pacientes com DM tipo 2. No início da cardiomiopatia diabética, adaptações estruturais e funcionais são promovidas pelos distúrbios de metabolismo, como a sinalização metabólica da insulina, excesso de insulina ambiente, diminuição da absorção de glicose, disfunção mitocondrial. Coletivamente desenvolvem remodelação cardíaca, disfunção diastólica fibrótica em indivíduos diabéticos. Faltam conhecimentos dos mecanismos envolvidos no diabetes tipo 1 e 2 na disfunção cardíaca. Necessita de ensaios clínicos prospectivos para confirmação se os dois tipos de diabetes aumentam isoladamente o risco de disfunção cardíaca e insuficiência cardíaca, com ausência de outros fatores de risco (JIA; WHAKEY-CONNELL; SOWERS, 2017).

Baixo nível de lipoproteína de alta densidade (HDL colesterol) está relacionado a risco cardiovascular. Descontrole da glicemia, HDL-colesterol diminuído e distúrbios hemorrágicos (maior viscosidade plasmática e sanguínea, agregação eritrócitária aumentada e deformidade eritrócitária reduzida) associados, predizem eventos adversos coronarianos e doença coronariana. Estudo mostrou interação entre esses parâmetros, que podem contribuir para a progressão de aterosclerose, e trombose (CHO et al., 2016). A diminuição dos níveis de HDL-colesterol foi encontrada em pacientes que sofreram AVEI. Seu aumento reduz o risco em até 31% em homens com doença cardíaca congênita. É um importante removedor de colesterol dos tecidos periféricos para o fígado, metabolizador de quilomicrons e lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL colesterol) (PANDEY; SHRIVASTAVA; SOLANKI, 2016).

A relação entre aterosclerose e níveis elevados de lipídios plasmáticos está bem definida e observa-se a diminuição do risco de AVEI quando há tratamento eficaz diminuindo a dislipidemia. AVEI é causado por um súbito bloqueio das

artérias, diminuindo a passagem do sangue ao cérebro. O excesso de colesterol nas paredes da artéria diminui a luz interna do vaso, podendo haver formação de trombos. Sabe-se, porém, que a união de inflamação e hiperlipidemia pioram o prognóstico do AVEI. Há também relação entre níveis de lipoproteína de baixa densidade (LDL-colesterol) e AVEI. Acredita-se que a LDL seja a mais aterogênica. Experimentos mostraram sua presença em níveis maiores no tipo isquêmico comparado ao acidente tipo hemorrágico (ADIBHATLA; HATCHER, 2008).

Células espumosas se depositam na camada íntima das artérias após ingestão de LDL-colesterol pelos macrófagos. A progressão desses lipídeos forma ateromas ocasionando rompimento das artérias, surgindo doenças cardiovasculares, levando a infarto do miocárdio e acidentes vasculares encefálicos (DOMINGUES et al., 2017) Figura 3.

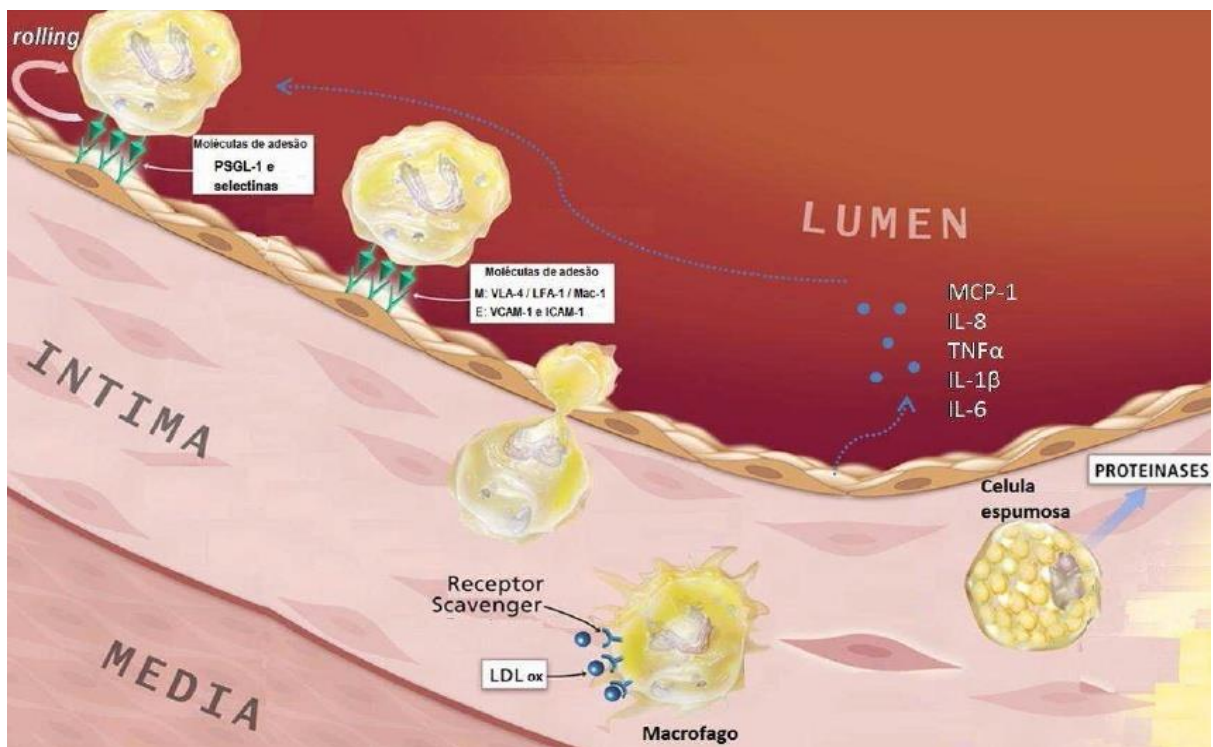


Figura 3: Instauração do processo aterosclerótico. O endotélio ativado libera citocinas e quimiocinas que atraem os monócitos ao sítio da lesão. Através das moléculas de adesão PSGL-1 e L-Selectina, os monócitos interagem com E e P-Selectina e PSGL-1 endoteliais mediando o *rolling*. A indução da expressão de VCAM-1 e ICAM-1 no endotélio permite a adesão estável dos monócitos através da interação com VLA-4, LFA-1 e Mac-1. Os monócitos migram para a camada íntima da artéria onde se diferenciam em macrófagos que, pela captura de LDLox, podem dar origem às células espumosas, com alto conteúdo lipídico, característica do ateroma. M, monócito; E, endotélio;

LDLoxLDL oxidada; IL, interleucina; MCP-1, proteína quimiotática de monócitos; TNF α , fator de necrose tumoral alfa; PSGL-1, glicoproteína ligadora de P-selectina; VLA-4, integrina $\alpha 4\beta 1$; LFA-1, $\alpha L\beta 2$; Mac-1, integrina $\alpha M\beta 2$; (MAUREIRA, 2013).

1.4.2 Ferritina e ferro

A maior parte do ferro armazenado no organismo está na forma de ferritina. Ferro é um metal crítico para o funcionamento normal do cérebro humano. O TNF- α e IL-2 regulam positivamente a síntese de ferritina em células mesenquimais, hepatócitos e monócitos-macrófagos independente da concentração de ferro (MILLER et., 1991).

Os níveis plasmáticos elevados de ferritina têm sido associados com deterioração neurológica precoce. Valores maiores que 275 mg/mL predizem, independentemente, a deterioração neurológica precoce em pacientes com infartos hemisféricos (DAVALOS et al., 2000).

O ferro é um metal fundamental para a homeostase do organismo, mas em excesso, pode ser deletério, aumentando o estresse oxidativo. Um desequilíbrio entre a formação de radicais livres e as enzimas antioxidantes que defendem o organismo dos seus danos, leva à oxidação de elementos celulares e moleculares, como por exemplo a neurodegeneração (FERNANDEZ et al., 2007).

Lehmann (2015) avaliou os níveis séricos de ferritina e verificou que valores mais elevados foram obtidos nos pacientes com maior déficit neurológico comparados aos controles.

1.5 Tratamento do AVE

O melhor tratamento para o AVEI 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 AVE 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 AVE e, por isso, é tido como um método de prevenção secundária. Cada caso de AVEI 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 AVE, 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 AVE e diminuir o custo a longo prazo com internações e tratamentos. O projeto prevê a criação de uma rede de assistência ao AVE 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 AVEI, 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 AVEI são fortemente recomendados. O protocolo recomendado pelo grupo de estudos de AVE do Ministério da Saúde do Brasil (BRASIL, 2013).

2 JUSTIFICATIVA

Os dados descritos na literatura sugerem que as alterações em provas inflamatórias na fase aguda do AVEI podem representar fatores importantes no seu prognóstico. Além disto, até a presente data são poucos os registros sobre o papel da resposta inflamatória e de alterações metabólicas no déficit neurológico e evolução clínica em pacientes da população sul-brasileira. Nosso grupo de pesquisa tem reportado resultados sobre a associação entre alterações inflamatórias e metabólicas e subtipos de AVEI, bem como com o déficit neurológico após o evento isquêmico e a evolução em curto prazo (LEHMANN, 2015). Também tem reportado associação entre a deficiência de vitamina D, a chance de ocorrência e déficit neurológico em curto prazo nestes pacientes (ALFIERI et al, 2016). No entanto, o papel dos marcadores inflamatórios, anti-inflamatórios e metabólicos na predição de morte nos pacientes que sofreram o AVEI ainda é pouco conhecido para a nossa população. Os resultados podem auxiliar na identificação de um conjunto de marcadores que possam prever o prognóstico destes pacientes e contribuir para a utilização de estratégias terapêuticas individualizadas que levem em consideração os diferentes mecanismos fisiopatológicos envolvidos no AVEI.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar marcadores inflamatório e metabólicos como preditores de morte em pacientes com acidente vascular encefálico isquêmico agudo.

3.2 Objetivos Específicos

- 3.2.1 Descrever as características demográficas, epidemiológicas e clínicas dos pacientes com AVEI agudo, atendidos no Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina (HU/UEL) de Londrina;
- 3.2.2 Avaliar a resposta inflamatória, antiinflamatória e metabólica em pacientes com AVEI agudo e em indivíduos saudáveis;
- 3.2.3 Determinar a associação entre as características demográficas, epidemiológicas e clínicas dos pacientes com AVEI agudo com a ocorrência de morte após três meses do evento isquêmico;
- 3.2.4 Verificar associação entre os marcadores inflamatórios, anti-inflamatórios e metabólicos obtidos nos pacientes com AVEI agudo com a ocorrência de morte após três meses do evento isquêmico.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi aprovado a fim de dar continuidade ao desenvolvimento de um projeto de pesquisa que avalia “Biomarcadores genéticos e de estresse oxidativo no Acidente Vascular Encefálico”, já aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos na UEL (Parecer 294/2011, CAAE: 0250.0.268.000-11, Folha de Rosto: 462193, no qual foram inseridos 288 pacientes com possível diagnóstico de AVEI agudo, Anexo 1). 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 (Anexo 2A e 2B).

4.1 Delineamento

Foi realizado um estudo observacional, prospectivo, longitudinal e de seguimento.

4.2 Participantes

Pacientes com provável diagnóstico de AVEI agudo, adultos, de ambos os sexos, que deram entrada no Pronto Socorro do Hospital Universitário da UEL (HU/UEL), em Londrina, Paraná. Foi convidado a participar do estudo um total de 288 indivíduos. O convite foi realizado de forma consecutiva, no período de janeiro de 2013 a janeiro de 2015. Neste mesmo período, foram convidados indivíduos adultos, de ambos os sexos, sem histórico de AVE e infarto agudo do miocárdio. Participou candidatos a doação de sangue do Hemocentro Regional de Londrina e da população geral para formação do grupo controle.

4.3 Amostra e coleta de dados

Amostras de pacientes diagnosticados pelo exame clínico e TC de crânio e/ou RMN, num total de 145 pacientes com AVEI agudo. Tipo de amostra consecutiva, de conveniência de tempo e local. O AVEI 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 RMN. Para classificar os subtipos de AVC utilizou-se o Ensaio

de ORG 10172 no Tratamento de Acidente Agudo (TOAST) para categorizar os cinco mecanismos de AVEI (ADAMS, 1993) descritos na introdução deste documento.

A avaliação do estado de incapacidade funcional foi realizada pela escala de Rankin modificada (mRS) (BONITA, BEAGLEHOLE, 1988; CHENG et al, 2014) aplicada em até oito horas da admissão no hospital (*baseline*). Os pacientes foram prospectivamente acompanhados após três meses do evento isquêmico, por meio de consulta ambulatorial ou entrevista telefônica com o paciente ou o mais próximo dele ou responsável, quando apropriado (OH et al., 2011). Neste momento, foram coletados dados sobre os cuidados médicos recebidos durante o período de seguimento, o estado funcional após o AVEI ou a mortalidade, de acordo com o instrumento descrito no Anexo 3. No caso de óbito, o avaliador solicitava a data do mesmo e se foi em decorrência do AVEI ou por outra causa não relacionada ao evento isquêmico.

O grupo controle foi composto de 176 indivíduos selecionados entre candidatos a doadores de sangue fidelizados do Hemocentro Regional de Londrina e indivíduos da população geral de Londrina. Os testes sorológicos realizados para todos participantes do grupo controle foram os de rotina para bancos de sangue, exigidos pela portaria ministerial para doadores de sangue (BRASIL, 2004). Foram testados anticorpos contra o vírus da imunodeficiência humana (HIV) tipos 1 e 2, anticorpos contra o vírus da hepatite C (HCV), antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBV), anticorpos contra o antígeno *core* do HBV, anticorpos contra o vírus linfotrópico de células T humanas tipos I e II (HTLV I/II), anticorpos anti-*Trypanosomacruzi*, teste não treponêmico para sífilis, além de não terem história de evento isquêmico.

Foram coletados dados demográficos (idade, sexo e etnia), epidemiológicos como fatores de risco associados ao AVEI (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.

Para definir hipertensão considerou-se como critérios PAS ≥ 130 mmHg e PAD ≥ 90 mmHg ou uso de anti-hipertensivo (JAMES et al., 2014). Definição de DM tipo 2 foi glicemia em jejum ≥ 126 mg/dL, e não-jejum ≥ 200 mg/dL e/ou o uso de medicamentos hipoglicemiantes (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014). Dislipidemia foi definida pela presença de uma ou mais das concentrações anormais de lipídeos no soro, como colesterol total ≥ 200 mg/dL, LDL colesterol ≥ 130 mg/dL; HDL colesterol < 40 mg/dL para homem e < 50 mg/dL para mulher (GRUNDY et al., 2004).

4.4 Critérios de Exclusão

Como critérios de exclusão, inseriram-se aqueles que recusaram a participar do estudo; que apresentavam processo inflamatório autoimune ou infeccioso; pacientes em uso crônico de corticosteróides ou imunossupressores; portadores de doença renal crônica, hepatopatia crônica, neoplasias, doença de Alzheimer, doença de Parkinson; os que apresentaram AIT, AVEH, infarto agudo do miocárdio; pós-operatório imediato; trauma nos últimos 30 dias, pacientes com dados incompletos ou que não tinham amostra biológica para as análises laboratoriais previstas. Destes, somaram um total de 120 pacientes.

4.5 Exames Laboratoriais

Para o grupo de pacientes, as amostras de sangue periférico foram coletadas com e sem condições de jejum. Para o grupo controle, foram coletadas amostras de sangue periférico em condição de jejum. Dos pacientes as amostras foram coletadas nas primeiras 24 horas da admissão no hospital. Coletou-se 10 mL de sangue em tubo à vácuo sem anticoagulante e dois tubos de 10 mL com anticoagulante EDTA. O material foi encaminhado imediatamente ao laboratório para registro, processamento e armazenamento das amostras. Soro e plasma 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 AVEI no HU/UEL 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 de normalidade estabelecidos pelos fabricantes dos reagentes utilizados.

4.5.1 Marcadores inflamatórios

Os exames de contagem total de leucócitos periféricos (células/mm³) e VHS (mm/1^ahora) foram realizados por método automatizado (equipamento MINDRAY-BC 6800,/ ALIFAX- TEST1 THL, respectivamente), sendo que os resultados de leucócitos foram categorizados em <10.570 células/mm³ e ≥10.570 células/mm³; e o VHS < 22,50mm/1^ahora e ≥ 22,50 mm/1^ahora para análise estatística.

A dosagem dos níveis plasmáticos de citocinas IL-6 foi realizada por método imunoenzimático (ELISA- eBioscience), com limite de detecção de 1,0 ng/mL, de acordo com o fabricante. Os resultados foram categorizados em <20,40 ng/ml e ≥ 20,40 ng/ml.

Os níveis séricos de usPCR foram avaliados imunoensaio de micropartícula com quimioluminescência (AbbottLaboratory-Architech™), com sensibilidade analítica de 0,175 mg/L. Os valores foram categorizados em <13,50mg/L e ≥ 13,50 mg/L.

Como marcador do estresse oxidativo, foram avaliados os níveis plasmáticos de hidroperóxidos lipídicos pela técnica de quimiluminescência (QL) induzida por terc-butil-hidroperóxido (CL-COOH) como descrito por Gonzales-Flecha e colaboradores (1991). Os resultados foram expressos em contagens por minuto (cpm).

4.5.2 Marcadores anti-inflamatórios

Os níveis séricos da 25-hidroxivitamina D [25(OH)D] foram determinados por imunoensaio de quimiluminescência por micropartículas (Abbott Laboratório-Architech™). De acordo com os níveis séricos de 25(OH)D, os valores foram categorizados em < 18,90 ng/ml e ≥ 18,90 ng/ml.

4.5.3 Marcadores metabólicos

Foram analisados marcadores metabólicos como níveis séricos de proteínas totais, HDL colesterol, ferro e glicemia por método automatizado (Dade Behring-Dimension Dade AR). Os valores de proteínas totais foram categorizadas em <6,68g/dl e ≥ 6,68g/dl para análise estatística. Os valores para ferro sérico foram categorizados para homens entre 65-175 µg/dL e mulheres entre 50-170 µg/dL.

A dosagem de insulina foi avaliada por imunoensaio de micropartícula com quimiluminescência (Abbott Laboratory-Architech™), e valores maiores que 10,4 µU/mL foi considerado significativamente elevado.

Os níveis séricos de ferritina foram avaliados por imunoensaio de micropartícula com quimiluminescência (Abbott Laboratory-Architech™), sendo que valores > 274,7 ng/mL e > 204,0 ng/mL foram considerados elevados para homens e mulheres, respectivamente, segundo as recomendações do fabricante.

4.6 Análise Estatística

As análises de contingência (teste χ^2) foram utilizadas para verificar as associações entre as variáveis categóricas e grupos de diagnóstico. Foram avaliadas as diferenças das variáveis contínuas entre os grupos utilizando análises de variância (ANOVA), seguidas pelo teste de Tukey para examinar as comparações múltiplas entre médias de grupos. As variáveis categóricas foram expressas em número absoluto (n) e o percentual (%), e as variáveis contínuas foram expressos como média ± erro padrão da média (SEM).

Modelo de análise linear geral (GLM) foi utilizado para avaliar os efeitos de multivariáveis das variáveis preditoras (como AVEI, idade, sexo, tabagismo, DM, hipertensão, dislipidemia e uso de medicamentos) nos marcadores inflamatórios,

anti-inflamatórios e metabólicos como variáveis dependentes. Quando os testes multivariados foram significativos foram usados testes de efeitos entre as variáveis para delinear o efeito univariado de cada variável explanatória. Portanto, não foram utilizados testes para correção do valor de “p” para interpretarmos os marcadores analisados devido ao fato dos testes univariados serem realizados somente quando os efeitos na análise multivariada foram significativos. Análises de regressão logística multinomial graduais automáticas, utilizando as variáveis com valor de $p < 0,1$, foram utilizadas para delinear os marcadores que foram mais significativamente associados com AVEI e os que poderiam prever os escores de déficit neurológico (mRS) na admissão do paciente e após três meses do evento isquêmico. *Odds ratio* (OR) e intervalo de confiança (IC) de 95% foram calculados. A análise estatística foi realizada com SPSS para Windows, versão 22 (SPSS Inc., CHIGADO, IL, EUA). A significância estatística foi definida como $p < 0,05$.

Os marcadores inflamatórios e metabólicos foram categorizados biomarcadores. Foram categorizados como índice inflamatório 1 e 2 (todos expressos em Z escores). O índice inflamatório 1 foi considerado como: usPCR, IL-6, ferritina, VHS e leucócitos periféricos. O índice inflamatório 2 foi considerado como: índice inflamatório 1 menos [25(OH)D, ferro e proteínas totais].

5 RESULTADOS

Os resultados obtidos neste trabalho foram apresentados e discutidos em um artigo original científico intitulado: “***Prediction of death following stroke by immune-inflammatory and metabolic biomarkers***”, e submetido à revista Molecular Neurobiology, com fator de impacto 6.190, conforme e-mail em Anexo 4.

5.1 Artigo

Immune-inflammatory, oxidative stress and metabolic biomarkers predicting death after acute ischemic stroke

Edna Maria Vissoci Reiche¹, Jair Roberto Gelinski², Daniela Frizon Alfieri³, Tamires Flauzino³, Marcio Francisco Lehmann⁴, Maria Caroline Martins de Araújo⁵, Marcell Alysson Batisti Lozovoy¹, Andrea Name Colado Simão¹, Elaine Regina Delicato de Almeida¹, Michael Maes^{6,7,8}

¹Department of Pathology, Clinical Analysis, and Toxicology, Health Sciences Center, State University of Londrina, Paraná, Brazil;

² Clinical and Laboratory Pathophysiology Postgraduate Program, Health Sciences Center, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil;

³ Health Sciences Postgraduate Program, Health Sciences Center, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil

⁴ Department of Clinical Surgery, Health Sciences Center, and Neurosurgery Service of the University Hospital, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil;

⁵ Neurology Postgraduate Program, Health Sciences Center, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil;

⁶ IMPACT Strategic Research Centre, School of Medicine, Deakin University, Geelong, Victoria, Australia.

⁷ Department of Psychiatry, Faculty of Medicine, Chulalongkorn, University, Bangkok, Thailand

⁸ Department of Psychiatry, Medical University Plovdiv, Plovdiv, Bulgaria

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: Acute ischemic stroke (AIS) is accompanied by peripheral activation of immune-inflammatory pathways, including elevated levels of C-reactive protein (CRP) and interleukin (IL)-6, lipid peroxidation and lowered antioxidant defense, such as vitamin D.

Aim: To examine whether death within 3 months after AIS is predicted by immune-inflammatory, oxidative stress and metabolic biomarkers measured within 24 hr after AIS onset.

Methods: We recruited 176 normal volunteers and 146 AIS victims and measured IL-6, CRP with high sensitivity method (hsCRP), ferritin, iron, total serum protein (TSP), erythrocyte sedimentation rate (ESR), white blood cells, 25 hydroxyvitamin D [25(OH)D], lipid hydroperoxides (CL-LOOH), insulin, glucose and high density lipoprotein (HDL)-cholesterol within 24 hr after AIS onset.

Results: Non-survivors within 3 months after AIS (n=54) showed higher baseline levels of IL-6, hsCRP, ferritin and glucose and lower levels of HDL-cholesterol and 25(OH)D than survivors (n=91). Non-survivors showed higher ESR and lowered TSP than controls, while survivors occupied an intermediate position. Binary regression analysis showed that death after AIS is best predicted by increased IL-6, glucose, ferritin and CL-LOOH and lowered 25(OH) levels. A z unit weighted composite score based on immune-inflammatory biomarkers predicted death after AIS with sensitivity of 71.7% and specificity of 87.1%.

Conclusion: Activation of peripheral immune-inflammatory and oxidative pathways is critically associated with high mortality rates after AIS. Our results may help to develop new biomarker tools, which predict post-stroke death, and show that IL-6 trans-signaling coupled with redox imbalances are new drug targets in the prevention of death after AIS.

KEYWORDS: Ischemic stroke, mortality, inflammation, IL-6, vitamin D, biomarkers

INTRODUCTION

Stroke is a major global health problem and the majority of global stroke burden is in low- and middle-income countries (Benjamin et al., 2017). While age-standardised rates of stroke mortality have decreased worldwide in the past two decades, the absolute number of people who have a stroke every year, live with the consequences of stroke, and die from their stroke is increasing (Feigin et al., 2015). In 2013, there were globally almost 25.7 million stroke survivors with 71% with acute ischemic stroke (AIS), 6.5 million deaths from stroke (51% died from AIS), 113 million disability-adjusted life-year (DALYs) due to stroke (58% due to AIS), and 10.3 million people having a first stroke (67% AIS) (Feigin et al., 2015). Around one third of stroke victims die and another one third being permanently disabled and requiring permanent residential care (Townsend et al., 2012; Benjamin et al., 2017). Among patients with cardiovascular disorder (CVD), stroke is the second most important contributor to hospital care costs explaining the high socioeconomic costs of this event (Townsend et al., 2012; Benjamin et al., 2017).

Stroke results from the cumulative, long-term effects of irreversible factors, including age, sex, and ethnicity, as well as modifiable risk factors, including hypertension, heart diseases, diabetes mellitus (DM), body mass index (BMI), hyperlipidemia, smoking, excess alcohol consumption, and sedentary life style (Sacco et al., 1997; Chen et al., 2014; Huo et al., 2013; Benjamin et al., 2017). The risk of having a stroke increases with age and doubles each decade after the age of 55 years (Sacco et al., 1997; Benjamin et al., 2017), while men show a higher incidence of stroke than women (Sacco et al., 1997; Benjamin et al., 2017). The risk of stroke is increased in individuals with hypertension, especially in those with systolic blood pressure (SPB) ≥ 140 mm Hg (Sacco et al., 1997; Chen et al., 2014; Choudhury et al., 2015; Benjamin et al., 2017). Increased BMI or body weight are associated with stroke risk factors including hypertension thereby increasing risk of stroke (Kurth et al., 2002; Choudhury et al., 2015; Benjamin et al., 2017). Metabolic biomarkers associated with BMI and DM also increase stroke risk, including increased insulin resistance, hyperinsulinemia and glucose intolerance (Denti, Licia et al., 2003; Choudhury et al., 2015; Benjamin et al., 2017). Increased levels of low-density lipoprotein (LDL)-cholesterol are associated with acute ischemic stroke (AIS), while high-density lipoprotein (HDL)-cholesterol may have protective effects (Luo et al., 2014; Demarin et al., 2010). Current smoking may increase the risk to develop stroke (Chen et al., 2014; Choudhury et al., 2015; Benjamin et al., 2017).

Interruption of cerebral blood flow by embolism or a thrombus causes AIS leading to necrotic and glutamate-related excitotoxic cell death in the ischemic core (Tobin et al., 2014; Rodrigo et al., 2013; Coull et al., 2004). Neuroinflammatory (microglia activation) and oxidative processes following AIS are critically involved

in the primary insult leading to apoptosis, necrosis or autophagy and consequent brain cell death in the penumbra (Rodrigo et al., 2013; Tobin et al., 2014; Becker et al., 2016; McDonough et al., 2016). Reperfusion is accompanied by secondary neurotoxic responses induced by a second burst in reactive oxygen species (ROS) and neuroinflammatory responses including increased production of pro-inflammatory cytokines, such as interleukin (IL)-6, IL-1 β and tumor necrosis factor (TNF)- α (Tobin et al., 2014; Rodrigo et al., 2013). Moreover, peripheral activation of immune-inflammatory pathways occurring after stroke plays a critical role in neurological outcome (Chapman et al., 2009). Immune and oxidative mediators generated in the brain may propagate into the systemic blood (spill-over) causing a peripheral immune-inflammatory response (Anrather and Iadecola 2016). Increased ROS and altered endothelial cell functions disrupt the blood brain barrier (BBB) contributing to infiltration of blood-derived neutrophils, M1 macrophages and activated T cells thereby aggravating neuroinflammation and neurotoxicity (Tobin et al., 2014; Anrather and Iadecola 2016; Shirley et al., 2014; Rodrigo et al., 2013; Wang et al., 2007). Moreover, experimental stroke causes a peripheral immune-inflammatory response, which peaks 4 h after stroke and precedes the peak in neuroinflammation 20 h later. This response is characterized by elevated levels of plasma IL-6 and C-reactive protein (CRP) (Chapman et al., 2007), the latter being associated with a worse clinical outcome (Matsuo et al., 2016). Likewise, stroke is accompanied by peripheral signs of lipid peroxidation including increased lipid peroxides and lowered levels of antioxidant defenses, including vitamin D (Rodrigo et al., 2013; Poole et al., 2006).

One third of stroke individuals will die within some months from stroke or its complications (World Health Organization). Mortality after stroke is one of the leading causes of death worldwide (Feigin et al., 2015; Strong et al., 2007; Sacco et al., 1997). Short-term (1 week - 3 months) post-stroke death is predicted by fever, age, plasma glucose levels, previous stroke, severity of neurological deficits and size of lesion (Koton et al., 2010; Henon et al., 1995; Das et al., 2012; Adam et al., 1999). Nevertheless, there are no data whether peripheral signs of activated immune-inflammatory pathways within 24 hr after stroke onset may predict stroke-associated mortality 3 months later. In patients with atrial fibrillation, increased IL-6 and CRP levels predict cardiovascular events and death (Aulin et al., 2015). All-cause mortality due to for example CVD, pneumonia, cancer and chronic kidney disease is predicted by a number of immune and metabolic biomarkers including IL-6, CRP, albumin and glucose levels, white blood cell (WBC) counts and oxidative stress biomarkers of lipid peroxidation (Bruunsgaard et al., 2003; Lepper et al., 2012; Goodson et al., 2005; Singh-Manoux et al., 2017; Ridker, 2008; Proctor et al., 2015; Huerta et al., 2005).

Hence, the aim of the present study is to examine whether death within 3 months after AIS is predicted by immune-inflammatory, oxidative stress and metabolic biomarkers measured within 24 hr after stroke onset including IL-6, CRP, WBC count, erythrocyte sedimentation rate (ESR), ferritin, lipid hydroperoxides, vitamin D, iron and total serum protein (TSP), HDL-cholesterol, plasma insulin and glucose levels, while adjusting for extraneous and confounding variables, including age, sex, smoking, BMI, DM and hypertension.

MATERIAL AND METHODS

Study subjects

The protocol was approved by the Institutional Research Ethic Committee of the State University of Londrina, Paraná State, Brazil (CAAE 0250.0.268.000-11) and a written consent form was obtained from all of the individuals. A total of 145 AIS patients diagnosed with focal neurological signs or symptoms thought to be of vascular origin that persisted for >24 h, confirmed by brain computed tomography (CT) and clinic examination in baseline conditions were consecutively recruited during January 2013-2015 from the Emergency Room of the University Hospital of State University of Londrina. 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; BEAGLEHOLE, 1988) applied within the first 24 h of admission (mRS baseline) and the values were used to categorize the patients as mild functional impairment (mRS <3) and moderate/severe functional impairment (mRS \geq 3). The mRS was also applied after three-month follow-up through clinical examination or using telephone interviews with the patients or their relatives (WANG et al., 2014) and the values were used to categorize the patients as stroke survivors (mRS <6) and stroke death (mRS=6) (PARK et al., 2015). All the patients were managed using a standardized protocol adapted from international guidelines for managing AIS (BRAZIL, 2013).

As controls, 176 healthy individuals from general population of Londrina were enrolled in the same period, with similar demographic and anthropometric characteristics and no history of stroke/ myocardial infarction.

Exclusion criteria for patients and controls were recent history of fever within last seven days prior to onset of stroke symptoms, acute inflammatory diseases, haemorrhagic stroke, acute transient ischemic attack (AIT); chronic infectious, such as human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1), hepatitis B virus and hepatitis C virus infections, autoimmune diseases, renal or liver failure, 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.

Demographic, epidemiological, anthropometric and clinical data

Demographic, epidemiological, anthropometric, and clinical data with AIS risk factors and the use of any therapeutic drugs before the inclusion in this study were obtained using a standard questionnaire at the admission of the individuals. The anthropometric measures were verified by 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 (Asiatic, Black, and Afro-Brazilian) (BRAZIL, 2011). Baseline blood pressure evaluations were obtained at the admission of the individuals in the study (patients and controls) using digital apparatus properly calibrated, and the mean of these measurements was used in the analysis. Use of antihypertensive medication was an indication of hypertension (JAMES et al., 2014); DM was defined as a fasting serum glucose ≥ 126 mg/dL, a non-fasting serum glucose ≥ 200 mg/dL and/or use of hypoglycemic medication (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014); dyslipidemia was defined by the presence of one or more than one of the abnormal serum lipid concentration: total cholesterol ≥ 200 mg/dL, LDL-cholesterol ≥ 130 mg/dL; HDL-cholesterol < 40 mg/dL, and triglycerides > 150 mg/dL (NATIONAL CHOLESTEROL EDUCATION PROGRAM (NCEP) EXPERT PANEL ON DETECTION, EVALUATION, 2002).

Immune-inflammatory, metabolic, and oxidative stress biomarkers

Peripheral blood samples were obtained under non-fasting state, with and without EDTA as anticoagulant. From the stroke patients, the samples were obtained at the admission in the hospital; from controls, the samples were obtained at the time of inclusion in the study. Plasma and serum samples were immediately separated by centrifugation (2,500 rpm for 15 min) and stored in aliquots at -80 °C until analyzes. As immune-inflammatory biomarkers, plasma levels of IL-6 were evaluated using a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA, eBioscience, San Diego, California, USA); WBC counts and ESR were determined using hematological autoanalyzers; serum levels of CRP determined with high sensitivity method (hsCRP), and ferritin were determined using chemiluminescence microparticle assay (CMIA, Architect, Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA).

Among the metabolic biomarkers, the study included glucose, HDL-cholesterol, TSP, and iron levels that were evaluated using a biochemical auto-analyzer (Dimension Dade AR Dade Behring, Deerfield, IL,

USA); insulin and hydroxyvitamin D [25(OH)D] levels were determined using chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA) (Architect, Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA). The oxidative biomarker lipid hydroperoxide-initiated chemiluminescence (CL-LOOH) was also determined to measure lipid hydroperoxides (GONZALEZ FLECHA; LLESUY; BOVERIS, 1991) and the results were expressed in counts per minute (cpm).

The immune-inflammatory and metabolic biomarkers were categorized as INFLAM index 1 and INFLAM index 2. INFLAM index 1 was computed as z transformation of hsCRP (z hsCRP) + z IL-6 + z ferritin + z ESR + z WBC count (expressed in z scores). INFLAM index 2 was computed as INFLAM index 1 – z 25(OH) D – z iron – z TSP (expressed in z scores)

STATISTICAL ANALYSIS

We used analyses of variance (ANOVA) to check between-group differences in scale variables and analyses of contingency tables (X^2 -tests) to check associations between nominal variables. Results of multiple comparisons were p-corrected for false discovery rate (Benjamini and Hochberg, 1995). We employed multivariate general linear model (GLM) analyses to delineate the effects of survival versus non-survival versus controls (the primary explanatory), and with immune, oxidative and metabolic biomarkers as dependent variables, while adjusting for extraneous variables including age, sex, diabetes, BMI, hypertension, smoking and use of medications. When the multivariate GLM analyses were significant, we employed tests for between-subject effects to assess the univariate effects of the explanatory variables. Model-generated estimated marginal means obtained by these GLM analyses were computed and protected, pairwise post-hoc analyses were used to assess the differences in estimated marginal means between the diagnostic groups. We used binary logistic regression analysis to delineate the most important biomarkers that are associated with post-stroke death. Receiver operating characteristic (ROC) curves were computed using the biomarkers predicting post-stroke death. The area under the ROC curve (AUC ROC), and sensitivity and specificity of the biomarkers for post-stroke death were computed. All statistical analyses were performed using IBM SPSS windows version 22. Tests were 2-tailed and an alpha level of 0.05 indicated statistically significant results.

We have computed two z unit weighted composite scores reflecting activation of peripheral immune-inflammatory pathways. The first (INFLAM index1) reflects the cumulative effects of CRP, IL-6, WBC count, ferritin and ESR and is computed as:

$$\text{INFLAM index1} = z \text{ transformation of hsCRP (zCRP)} + z\text{IL-6} + z\text{Ferritin} + z\text{WBC} + z\text{ESR}.$$

Consequently we have computed the sum of zTSP + zVitamin D + zIron (three biomarkers that decrease during immune-inflammatory responses) and computed the second index as:

$$\text{INFLAM index2} = \text{zINFLAM index1} - (\text{zTSP} + \text{zVitamin D} + \text{zIron})$$

RESULTS

Descriptive statistics

Table 1 shows the demographic data of the normal controls and patients divided into those who survived and those who died within the first 3 months after stroke. P-correction showed that the results of the multiple univariate tests presented in Table 1 remained significant after correction for false discovery rate. Nevertheless, the results are not adjusted for the various extraneous or confounder variables and thus less reliable than the results displayed in Tables 2-4, which were adjusted for extraneous and confounding variables. The data showed in Table 1 suggests the following: non-survivors were significantly older than patients who survived and normal controls ($p < 0.001$). There were significantly more males among patients with stroke, but no significant differences between survivors and non-survivors ($p < 0.001$). While there were no significant differences in BMI between the three study groups, patients with stroke showed a higher SBP and diastolic blood pressure (DBP) as compared to controls ($p < 0.001$). The mRS neurological deficit score at the admission (baseline mRS) was significantly higher in stroke patients who died *versus* survivors ($p < 0.001$).

Baseline HDL-cholesterol and insuline levels were significantly different between stroke patients and controls ($p < 0.001$), while glucose levels were significantly different among the three study groups and increased from controls to survivors and non-survivors ($p < 0.001$).

There were significantly more smokers among stroke patients as compared with controls and CL-LOOH levels were increased in stroke victims as compared with controls ($p = 0.001$ and $p < 0.001$, respectively). There were significant differences in INFLAM index 1 and INFLAM index 2 among the three groups with both values increasing from controls to stroke survivors to non-survivors ($p < 0.001$). There were no significant associations between subjects who suffered from a previous stroke and survivors *versus* non-survivors ($p = 0.328$). The prevalence of DM and hypertension, but not dyslipidemia, was significantly higher in stroke patients than in controls ($p < 0.001$ and $p = 0.788$, respectively).

Inspection of the intercorrelation matrices showed that IL-6 is significantly correlated with hsCRP ($r = 0.443$, $p < 0.001$, $n = 326$), while both IL-6 and hsCRP are correlated with ESR ($r = 0.327$, $n = 277$ and 0.434 , $n = 274$, respectively, $p < 0.001$) and WBC count ($r = 0.270$, $n = 295$ and $r = 0.457$, $p < 0.001$, $n = 294$). IL-6 and hsCRP

are also correlated with ferritin ($r=0.136$, $p=0.017$, $n=309$ and $r=0.231$, $p<0.001$, $n=311$, respectively, $p<0.001$) and iron ($r=-0.370$, $n=326$ and $r=-0.450$, $n=335$, respectively, all $p<0.001$). IL-6 and hsCRP are inversely correlated with HDL-cholesterol ($r=-0.246$, $n=331$ and $r=-0.309$, $n=340$, respectively, all $p<0.001$). IL-6 and hsCRP are positively correlated with glucose levels ($r=0.289$, $n=323$ and $r=0.417$, $n=333$, respectively, both $p<0.001$). IL-6 and hsCRP are also correlated with TSP ($r=-0.269$, $n=326$ and $r=-0.255$, $n=326$, respectively, both $p<0.001$) and 25(OH)D ($r=-0.202$, $n=323$ and $r=-0.295$, $n=332$, respectively, both $p<0.001$). INFLAM index1 is significantly correlated with 25(OH)D ($r=-0.335$, $p<0.001$, $n=243$), TSP ($r=-0.274$, $p<0.001$, $n=246$), iron ($r=-0.492$, $p<0.001$, $n=252$), glucose ($r=0.483$, $p<0.001$, $n=249$) and HDL-cholesterol ($r=-0.339$, $p<0.001$, $n=252$).

Immune/metabolic biomarkers of stroke survivors and deaths post-stroke versus controls

Table 2 shows the results of multivariate GLM analyses with INFLAM index1 and index2, CL-LOOH, HDL-cholesterol, glucose and insulin as dependent variables and diagnosis (the three study groups as shown in Table 1) as primary explanatory variable, while adjusting for sex, smoking, age and BMI. Tests for between-subject effects showed significant effects of diagnosis on all biomarkers. Post-hoc analyses performed on the model-generated estimated marginal mean values showed significant differences among the three study groups in INFLAM index1 and INFLAM index2, glucose and HDL-cholesterol with INFLAM index1 and INFLAM index2 increasing from controls to stroke survivors to stroke non-survivors. Insulin levels were significantly higher in stroke survivors than in controls and non-survivors. CL-LOOH levels were significantly higher in stroke patients than in controls. **Figure 1** shows the mean values of the INFLAM index 1 and INFLAM index2 in the three study groups.

Immune-inflammatory biomarkers of death after stroke

Figure 2 shows the z transformed values of the 11 biomarkers in the 3 study groups. **Table 3** shows the results of multivariate GLM analysis with effects of diagnosis (three study groups as in Table 2) as primary explanatory variable and sex, smoking, age and BMI as additional independent variables and with WBC count, IL-6, hsCRP, ferritin, ESR, 25(OH)D, TSP and iron as dependent variables. We found significant effects of all independent variables except BMI. Tests for between-subject effects showed a significant impact of diagnoses on all immune-inflammatory variables. Model-generated estimated marginal mean values and protected post-hoc analyses show that IL-6, hsCRP and 25(OH)D were significantly different between all three study samples. Thus, IL-6 and hsCRP increased, while 25(OH)D decreased from controls to stroke survivors to stroke non-

survivors. ESR was significantly higher, while TSP was significantly lower in post-stroke non-survivors and controls, with stroke survivors occupied an intermediate position. Serum ferritin levels were significantly higher in non-survivors *versus* controls and stroke survivors. Serum iron was lower while WBC count was greater in stroke patients than controls. Parameter estimates showed a significant association between age and IL-6, while BMI was positively associated with hsCRP and ESR. Ferritin was significantly higher in males than females.

Biomarkers of death after stroke (non-survivors versus survivors and controls)

Table 4 displays the results of a multivariate GLM analysis with the same immune-inflammatory and metabolic variables as shown in Table 2 as dependent variables and diagnosis (two study groups, namely non-survivors *versus* survivors + controls) as primary explanatory variable, while controlling for sex, smoking, age and BMI. Tests for between-subject effects showed a significant impact of diagnosis on INFLAM index1 and INFLAM index2, glucose and HDL-cholesterol. Model-generated estimated marginal mean values showed that INFLAM index1, INFLAM index2 and glucose were significantly higher, while HDL-cholesterol was significantly lower in stroke non-survivors than in survivors. Similar findings were established when examining the differences between non-survivors *versus* survivors ($F=3.55$, $df=6/70$, $p=0.004$). **Figure 3** shows the z transformed values of both INFLAM index 1 and INFLAM index2, HDL-cholesterol, insulin, glucose and CL-LOOH in both patient groups. The differences in INFLAM index1 ($F=8.60$, $df=1/75$, $p=0.004$), INFLAM index2 ($F=5.30$, $df=1/75$, $p=0.024$), glucose ($F=8.64$, $df=1/75$, $p=0.004$) and HDL-cholesterol ($F=4.84$, $df=1/75$, $p=0.031$) were significant.

Effects of confounding variables

The multivariate GLM analysis in Table 2 showed significant effects of sex, age and BMI on the dependent variables. Univariate tests showed significant effects of sex on INFLAM index2 (mean \pm SE: in females: 1.63 ± 0.45 and in males: 0.42 ± 0.45) and HDL-cholesterol levels (mean \pm SE: in females: -0.18 ± 0.14 and in males: -0.68 ± 0.14). Parameter estimates showed that age is associated with INFLAM index2 (positively) and HDL-cholesterol (inversely), while BMI is associated with INFLAM index2 and insulin (both positively).

We have also examined the possible effects of hypertension (n=118 subjects), diabetes (n=50 subjects) and dyslipidemia (n=63) on the results. There was a significant effect of hypertension ($F=4.38$, $df=6/155$, $p<0.001$), with between subject effects showing an impact on HDL-cholesterol ($F=9.95$, $df=1/160$, $p=0.002$; lower in those with hypertension) and glucose ($F=10.06$, $df=1/160$, $p=0.002$; higher in those with hypertension).

There was a significant effect of DM ($F=14.05$, $df=6/155$, $p<0.001$), with between-subject effects showing an impact on CL-LOOH ($F=5.29$, $df=1/160$, $p=0.023$; higher in DM) and glucose ($F=70.20$, $df=1/160$, $p<0.001$; higher in diabetes). There was a significant effect of dyslipidemia ($F=2.20$, $df=6/155$, $p=0.045$), which significantly impacted CL-LOOH ($F=4.69$, $df=1/160$, $p=0.032$) and glucose ($F=5.71$, $df=1/160$, $p=0.0189$ (both higher in dyslipidemia). Most importantly, the entry of these three diagnoses in the GLM regression shown in Table 2 did not change either the multivariate or the univariate results presented in Table 2 or the pairwise post-hoc tests showing differences between the three categories (also Table 2).

Consequently, we have examined possible effects of the drug state of the participants. Sixty-one subjects were taking antihypertensive drugs but we did not find significant effects of these drugs on the biomarkers shown in Table 2 ($F=1.58$, $df=6/146$, $p=0.158$). Use of hypolipemiant drugs (taken by 46 subjects) showed no significant effect on the biomarkers ($F=1.44$, $df=6/146$, $p=0.205$). In the multivariate analysis, treatment with hypoglycemic drugs ($n=38$) showed a significant effect ($F=7.89$, $df=6/146$, $p<0.001$), while tests for between-subject effects showed a significant effect on glucose only ($F=37.86$, $df=1/151$, $p<0.001$). Patients who were treated with hypoglycemic drugs have higher glucose values than those without (0.98 ± 0.14 *versus* 0.05 ± 0.11 , expressed in z scores). This indicates that patients with higher glucose levels were treated with hypoglycemic drugs, rather than causal effects of hypoglycemic drugs. Most importantly, the significant associations between diagnosis and the biomarkers shown in Table 2 and the significant differences in the biomarkers (see Table 2) remained unchanged after covarying for use of hypoglycemic, hypolipemiant and antihypertensive drugs.

Best prediction of death after stroke

In order to delineate the best predictors for death after AIS we have performed binary regression analyses with death following AIS as dependent variable (and no death as reference group) and using the biomarkers as explanatory variables. **Table 5** shows the results of two binary regression analyses with all biomarkers with (regression #2) or without (regression #1) baseline mRS as explanatory variables. We compared death due to AIS with all other subjects (combined controls and survivors; regression #1) or survivors only (regression #2). Regression #1 shows that glucose, ferritin, IL-6, CL-LOOH and 25(OH)D significantly predicted stroke death ($X^2=74.52$, $df=5$, $p<0.001$; Nagelkerke=0.461; correctly classified subjects=87.8% with 42.1% of sensitivity and 96.5% of specificity). The best predictor was IL-6 followed by glucose. Regression #2 shows that INFLAM index1 coupled with baseline mRS score significantly predicted death after AIS ($X^2=35.26$,

df=2, $p < 0.001$; Nagelkerke=0.361; correctly classified subjects=79.6% with 76.6% of sensitivity and 81.8% of specificity). We have rerun this analysis in the patient study groups, considering the separation of non-survivors *versus* survivors and the results showed that INFLAM index2 (Wald=11.94, df=1, $p=0.001$, OR=2.51) and CLOOH (Wald=7.67, df=1, $p=0.006$, OR=2.12) best predicted death after AIS *versus* survival ($X^2=22.72$, df=2, $p < 0.001$; Nagelkerke=0.279; correctly classified subjects=77.6% with 62.5% of sensitivity and 87.9% of specificity).

ROC curves

In order to examine whether some of the variables may be used in the clinical practice to predict death after AIS we have performed ROC curve analyses with the biomarkers as discriminatory variables. INFLAM index1 and INFLAM index2 showed the best diagnostic performance with an AUC equaling 0.851 and 0.870, respectively. INFLAM index1 showed that 71.7% of the death cases were correctly classified with specificity of 85.3%. hsCRP (AUC=0.776) and IL-6 (AUC=0.776) showed satisfactory results with a 48.6% of sensitivity and of 89.3% specificity for hsCRP > 13.5 mg/L and a 51.4% of sensitivity and 84.6% of specificity for IL-6 > 20.4 pg/mL. We have rerun these analyses in the patient study groups examining the discrimination of non-survivors *versus* survivors. For example, INFLAM index2 yielded a significant separation with an AUC ROC=0.728 [standard error (SE)=0.051] and a sensitivity=55.7% and specificity=75.0%.

Discussion

The main finding of this study is that death within 3 months after AIS is significantly predicted by immune-inflammatory, oxidative and metabolic biomarkers, which are measured within 24 hr after hospital admission. Thus, increased levels of IL-6, hsCRP, ferritin and glucose and lower levels of HDL-cholesterol, insulin and 25(OH)D were significantly associated with death after AIS. Moreover, higher ESR and lowered TSP were observed in stroke victims who had died as compared with normal controls, while stroke survivors occupied an intermediate position.

Increased peripheral levels of IL-6, which are associated with increased hsCRP, higher ESR and WBC counts, indicate that IL-6-associated immune-inflammatory responses play a critical role in death after stroke. These results extend those of previous reports showing that increased peripheral levels of IL-6 and hsCRP predict increased mortality in individuals with serious medical conditions (Goodson et al., 2005; Singh-Manoux et al., 2017; Ridker et al., 2007; Proctor et al., 2015; Groschel et al., 2007; Boger et al., XX; Aulin et al., 2015).

It may be hypothesized that increased IL-6 trans-signaling rather than classical IL-6 signaling is critically involved in mortality after stroke, because the former is pro-inflammatory and the latter is protective (Maes et al., 2014). Firstly, increased IL-6 trans-signaling and enhanced ROS production may reciprocally induce each other, causing greater oxidative damage to membrane lipids, proteins, DNA and mitochondria (Maes et al., 2014). Secondly, increased IL-6 may cause a T helper (Th)-17 shift with increased IL-17 production thereby facilitating autoimmune responses and formation of neoantigens directed against oxidatively modified lipid structures (Hirano et al., 2010; Jones et al., 2010; Maes et al., 2014). Thirdly, IL-6 trans-signaling may block the development of T regulatory (Treg) cells thereby changing the balance between autoreactive effector *versus* protective Treg cells (Dominitzki et al., 2007; Hirano et al., 2010). Fourthly, increased overexpression of IL-6 in plasma and the brain enhances neurodegenerative processes by aggravating neuro-inflammation, favouring recruitment of T cells to the brain, lowering hippocampal neurogenesis and neuroplasticity and enhancing the activity of the tryptophan catabolite (TRYCAT) pathway resulting in enhanced detrimental effects through N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors (Maes et al., 2014; Erta et al., 2012; Anderson and Maes, 2013). Nevertheless, to fully appreciate the effects of IL-6 trans-signaling we would need additional measurements of the soluble IL-6 receptor (sIL-6R), which may bind sIL-6 to form a sIL-6R/IL-6 complex that propagates IL-6 trans-signaling, and soluble gp130 molecule, which attenuates IL-6 trans-signaling (Maes et al., 2014).

The current study found that increased ferritin is a biomarker of stroke and death after stroke. Increased plasma levels of ferritin indicate the presence of an immune-inflammatory or acute phase response (Maes et al., 1996; Millerot et al., 2005; Kell and Pretorius, 2014; Wang et al., 2010). Interestingly, elevated levels of plasma ferritin measured within 24 to 48 h after stroke may predict a worse prognosis after stroke (Davalos et al., 2000; Erdemoglu and Ozbakir et al., 2002), while increased ferritin levels are a risk factor for consequent AIS in postmenopausal women (van der, 2005). In a rodent model, induced brain ischemia is accompanied by increased levels of plasma ferritin in rats subjected to severe insults (Millerot et al., 2005). In our study, plasma iron levels were not associated with post-stroke death but were significantly lower in stroke patients than in controls. Generally, activation of immune-inflammatory pathways is accompanied by reduced serum iron and other erythron markers (Maes et al., 1986). The associations between stroke and serum iron (lowered) and ferritin (increased) may be explained by effects of IL-6 trans-signaling. Thus, IL-6 enhances hepatic ferritin production and lowers plasma iron through effects of IL-6 on hepcidin, the main regulator of plasma iron levels (Maes et al., 1986; Kobune et al., 1994; Nakagawa et al., 2014). Also our findings show significant inverse associations between increased IL-6 (and the consequent elevations in hsCRP) and increased ferritin and lowered iron levels.

Reduced plasma iron and elevated ferritin have protective functions during immune-inflammatory responses mainly by preventing iron overload, which may have direct effects on ferroptosis (Morris et al., 2017), the development of thrombosis (Day et al., 2003) and enhanced hydroxyl radical production through the Fenton reaction (Miller et al., 2016). Moreover, ferritin stores cellular iron thereby attenuating the production of hydroxyl radicals and, therefore, increased ferritin protects against the consequences of oxidative stress (Wang et al., 2010; Zielinska-Dawidziak, 2015). Nevertheless, ferritin may also display detrimental effects including nuclear factor- κ B activation, induction of apoptosis and increased ROS production through its iron-storing ability (Lombardi et al., 2016; Knovich et al., 2009; Bresgen et al., 2010).

Another major finding of this study is that increased levels of lipid hydroperoxides (CL-LOOH), an oxidative stress biomarker, are associated with death after stroke. Previously, it was shown that stroke is accompanied by increased levels of CL-LOOH and malondialdehyde (MDA) (Rodrigo et al., 2013) and that increased MDA levels predict mortality in institutionalized elderly, while antioxidant defenses, such as superoxide dismutase and vitamin E are associated with survival (Huerta et al., 2005). As explained in the Introduction section of the present study, increased ROS production and damage to lipids and proteins, DNA and mitochondria is a key component of neuronal damage in the penumbra, while ROS-induced BBB disruption may lead to increased passage of activated T cells, effector cells and M1 macrophages (Rodrigo et al., 2013). Moreover, ROS supports the formation of cerebral edema, the leading cause of death after stroke (Rodrigo et al., 2013). Vasogenic cerebral edema follows breakdown of the BBB and affects white matter, while cytotoxic edema is a primary mechanism of cerebral edema during ischemia by generating hydroxyl radical formation and formation of peroxynitrite (Rodrigo et al., 2013).

Our results also extend those of previous studies showing that AIS is accompanied by lowered serum vitamin D (Poole et al., 2006; Kim et al., 2017), and that lowered vitamin D increases risk towards AIS (Sun et al., 2012; Kienreich et al., 2013; Gupta et al., 2014; Manouchehri et al., 2017; Alfieri et al., 2017) and is inversely associated with mortality from stroke (Sheerah et al., 2018). An umbrella review, however, concluded that the association between increased vitamin D levels and lowered stroke risk is not very convincing (Theodoratou et al., 2014). Nevertheless, lowered vitamin D is associated with more severe stroke, while vitamin D supplementation may improve the outcome of stroke (Narasimhan et al., 2017). In patients with myocardial infarction, vitamin D deficiency is linked with post-infarction complications, cardiac remodeling and the number of affected coronary arteries, while in peripheral artery disease vitamin D deficiency is associated with atherosclerosis and arterial stiffness, arterial aging and vascular calcifications (Mozos and Marginean, 2014).

There is an inverse, dose-response relationship between lowered plasma vitamin D concentrations and blood pressure (Kienreich et al., 2013; Mozos and Marginean, 2014). Moreover, vitamin D deficiency is associated with other modifiable predictors of stroke, including increased BMI and the metabolic syndrome (Mozos and Marginean, 2014). Nevertheless, these established effects of vitamin D deficiency are probably less relevant to the higher mortality after stroke because none of the above stroke risk factors is significantly associated with death after stroke. More importantly, vitamin D has strong anti-inflammatory, antioxidant and neuroprotective effects (Kienreich et al., 2013; Calton et al., 2015). Notably, vitamin D may suppress expression and/or production of pro-inflammatory mediators and cytokines, including IL-6 (Calton et al., 2015; Berridge, 2017). Vitamin D enhances superoxide dismutase activity, improves glutathione system activities, controls the expression of Nrf2, maintains mitochondrial respiration and protects against lipid peroxidation (Mokhtari et al., 2017; Berridge, 2017). Moreover, vitamin D has neuroprotective properties, for example by enhancing neurotrophin release and intracellular calcium homeostasis, and reduces neuronal injury and inflammation following traumatic brain injury (Lawrence and Sharma, 2016; Wrzosek et al., 2013). Therefore, the inverse association between vitamin D and the inflammation indexes (INFLAM index1 and INFLAM index2) found in the current study, may suggest that lowered vitamin D levels in AIS victims aggravate the ongoing immune-inflammatory and oxidative responses and attenuate neuroprotection thereby contributing to detrimental processes leading to death.

Finally, we also observed that two “metabolic” variables significantly predicted death after AIS, namely HDL-cholesterol and glucose. Our results extend previous findings that increased blood glucose levels may predict risk of early death in heart failure patients and in patients hospitalized for pneumonia (European Society of Cardiology, 2015; Lepper et al., 2012). Previous reports showed that aberrations in glucose metabolism may predict stroke (Choudhury et al., 2015) and that glucose intolerance highly significantly increases risk of brain infarction in nondiabetic individuals (Denti, Licia et al., 2003). In animal models of ischemia, hyperglycemia is associated with increased neuronal damage (Ginsberg et al., 1980; Pulsinelli et al., 1982). Following intracerebral hemorrhage, hyperglycemia exacerbates brain edema and causes perihematoma cell death (Song et al., 2003). Blood glucose may cross the BBB and may promote free radical generation, impair radical scavenging and glutathione cycle functions, induce aberrant osmolarity in brain cells, and promote protein glycation with formation of advanced glycation end-products (Tomlinson and Gardiner, 2008).

There is also some evidence that HDL-cholesterol may protect against stroke (Choudhury et al., 2015). Decreased HDL-cholesterol is associated with AIS especially in individuals less than 70 years old (Luo et al.,

2014). Individuals with lower HDL-cholesterol show a trend towards higher stroke risk (Demarin et al., 2010) and increased risk towards cardiovascular events (Acharjee et al., 2013; Demarin et al., 2010). Interestingly, in our study there was a significant inverse association between HDL-cholesterol levels and inflammation indexes, IL-6 and hsCRP levels, suggesting that attenuated HDL-cholesterol-associated antioxidant defenses participate in the immune-inflammatory pathophysiology of death after stroke. In the plasma, paraoxonase 1 (PON1) is integrated into HDL-cholesterol and protects HDL-cholesterol from oxidation and stimulates cholesterol efflux from macrophages (Gugliucci and Menini, 2014; Efrat and Aviram, 2010; Watson et al., 1995). The HDL-PON1 complex also protects against macrophage-mediated oxidation of LDL-cholesterol and shows anti-inflammatory properties (Mackness and Mackness, 2015; Costa et al., 2005), for example by attenuating IL-6 production (Gomaschi et al., 2005). During inflammation and oxidative stress, myeloperoxidase (through increased HOCl production) and peroxynitrite may damage the PON1-HDL complex (Gugliucci and Menini, 2014) resulting in increased lipid peroxidation and aldehyde formation (Gugliucci and Menini, 2014). In our study, TSP was significantly lower in stroke non-survivors *versus* healthy controls, while survivors showed an intermediate position. Moreover, there was a significant inverse association between TSP and the z unit weighted inflammation index as well as IL-6 and hsCRP. An acute phase response is indeed accompanied by lowered levels of TSP and albumin, indicating that lowered TSP is an indicant of the ongoing inflammatory process (van Hunsel et al., 1996).

In our study, significant associations were established between AIS and male sex, hypertension, DM and smoking, but not dyslipidemia. Nevertheless, we could not observe that any of these AIS predictors was associated with death after stroke. Most importantly, the associations between death after stroke and the abovementioned biomarkers remained significant after adjusting for these established predictors of AIS. Nevertheless, non-survivors showed a higher age than survivors, while increasing age also contributes to INFLAM index² and HDL-cholesterol. This indicates that aberrations in immune-inflammatory and oxidative pathways fueled by changes in HDL-cholesterol and glucose levels are more important in predicting death than the established predictors of stroke, while age may have a minor contribution to the inflammatory response. Furthermore, in the present study we found that the effects of the biomarkers predicting death were not affected by use of hypoglycemic, hypolipemiant and antihypertensive drugs. This shows that in the clinical practice the predictive value of the biomarkers is not substantially affected by these different confounding and extraneous variables.

In this respect, we computed z unit weighted composite scores based on immune-inflammatory biomarkers, which yielded a good prediction of death 3 months after stroke with a sensitivity of 71.7% and specificity of 87.1%. Using more immune-inflammatory biomarkers, including other cytokines and receptor levels such as IL-1 β and soluble IL-1 receptor antagonist (sIL-1RA), TNF α and its sTNF-receptors, sIL-6R, IL-4 and IL-10, may result in a better prediction of death after stroke. In addition, the measurement of more oxidative stress variables including xanthine oxidase, superoxide dismutase, catalase, PON1 and glutathione peroxidase, and lipid and protein oxidation products, including MDA, 4-hydroxynonenal, protein carbonyls or advanced protein oxidation products (AOPP), may also help to enhance the diagnostic performance of our composite scores.

Importantly, our results show that activated immune-inflammatory pathways, oxidative stress and lowered levels of vitamin D and HDL-cholesterol are new drug targets in the prevention of death after AIS. New possible treatments are targeting immune-inflammatory pathways by IL-6 trans-signaling blockade (Tocilizumab) and maybe blockade of TNF- α signaling (Etanercept) and IL-1 β signaling. Moreover, compounds with combined anti-inflammatory, antioxidant and neuroprotective properties may have some benefit including allopurinol, minocycline and statins (Maes et al., 2012; de Melo et al., 2017). These treatments can be combined with antioxidant supplements, which target the same pathways including vitamin D, curcumin, coenzyme Q10, resveratrol and zinc (de Melo et al., 2017).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

WHO. The Global burden of stroke.

http://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/cvd_atlas_15_burden_stroke.pdf

Feigin VL, McNaughton H, Dyal L. Burden of stroke in Maori and Pacific peoples of New Zealand. *Int J Stroke*. 2007 Aug;2(3):208-10. doi: 10.1111/j.1747-4949.2007.00140.x. Review. PubMed PMID: 18705945.

Feigin VL, Roth GA, Naghavi M, Parmar P, Krishnamurthi R, Chugh S, Mensah GA, Norrving B, Shiu I, Ng M, Estep K, Cercy K, Murray CJL, Forouzanfar MH; Global Burden of Diseases, Injuries and Risk Factors Study 2013 and Stroke Experts Writing Group. Global burden of stroke and risk factors in 188 countries, during 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet Neurol*. 2016 Aug;15(9):913-924. doi: 10.1016/S1474-4422(16)30073-4. Epub 2016 Jun 9. PubMed PMID: 27291521.

Strong K, Mathers C, Bonita R. Preventing stroke: saving lives around the world. *Lancet Neurol*. 2007 Feb;6(2):182-7. PubMed PMID: 17239805.

The Stroke Association. Stroke Statistics. As accessed 10-2-2018.

<http://www.thepossibilities.co.uk/assets/downloads/stroke-statistics.pdf>

The Internet Stroke Center. As assessed 10-2-2018.

worldwide.<http://www.strokecenter.org/patients/about-stroke/stroke-statistics/>

Sacco RL. Risk factors, outcomes, and stroke subtypes for ischemic stroke. *Neurology*. 1997 Nov;49(5 Suppl 4):S39-44. Review. PubMed PMID: 9371148.

Chen X, Zhou L, Zhang Y, Yi D, Liu L, Rao W, Wu Y, Ma D, Liu X, Zhou XH, Lin H, Cheng D, Yi D. Risk factors of stroke in Western and Asian countries: a systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. *BMC Public Health*. 2014 Jul 31;14:776. doi: 10.1186/1471-2458-14-776. Review. PubMed PMID: 25081994; PubMed Central PMCID: PMC4246444.

Yong H, Foody J, Linong J, Dong Z, Wang Y, Ma L, Meng HJ, Shiff S, Dayi H. A systematic literature review of risk factors for stroke in China. *Cardiol Rev*. 2013 Mar-Apr;21(2):77-93. doi: 10.1097/CRD.0b013e3182748d37. Review. PubMed PMID: 22990372.

Choudhury JH, Chowdhury TI, Nayeem A, Jahan WA. Modifiable and Non-Modifiable Risk Factors of Stroke. *Journal of National Institute of Neurosciences Bangladesh*, January 2015, Volume 1, Number 1, 22-26.

Kurth T, Gaziano JM, Berger K, Kase CS, Rexrode KM, Cook NR, Buring JE, Manson JE. Body mass index and the risk of stroke in men. *Arch Intern Med*. 2002 Dec 9-23;162(22):2557-62. PubMed PMID: 12456227.

Denti L, Cecchetti A, Annoni V, Merli MF, Ablondi F, Valenti G. The role of lipid profile in determining the risk of ischemic stroke in the elderly: a case-control study. *Arch Gerontol Geriatr*. 2003 Jul-Aug;37(1):51-62. PubMed PMID: 12849073.

Luo Y, Li J, Zhang J, Xu Y. Low HDL cholesterol is correlated to the acute ischemic stroke with diabetes mellitus. *Lipids Health Dis*. 2014 Nov 14;13:171. doi: 10.1186/1476-511X-13-171. PubMed PMID: 25395241; PubMed Central PMCID: PMC4240873.

Demarin V, Lisak M, Morović S, Cengić T. Low high-density lipoprotein cholesterol as the possible risk factor for stroke. *Acta Clin Croat*. 2010 Dec;49(4):429-39. Review. PubMed PMID: 21830454.

Tobin MK, Bonds JA, Minshall RD, Pelligrino DA, Testai FD, Lazarov O. Neurogenesis and inflammation after ischemic stroke: what is known and where we go from here. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2014 Oct;34(10):1573-84. doi: 10.1038/jcbfm.2014.130. Epub 2014 Jul 30. Review. PubMed PMID: 25074747; PubMed Central PMCID: PMC4269726.

Rodrigo R, Fernández-Gajardo R, Gutiérrez R, Matamala JM, Carrasco R, Miranda-Merchak A, Feuerhake W. Oxidative stress and pathophysiology of ischemic stroke: novel therapeutic opportunities. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2013 Aug;12(5):698-714. Review. PubMed PMID: 23469845.

Becker KJ, Buckwalter M. Stroke, Inflammation and the Immune Response: Dawn of a New Era. *Neurotherapeutics*. 2016 Oct;13(4):659-660. doi: 10.1007/s13311-016-0478-7. PubMed PMID: 27677606; PubMed Central PMCID: PMC5081111.

Chapman KZ, Dale VQ, Dénes A, Bennett G, Rothwell NJ, Allan SM, McColl BW. A rapid and transient peripheral inflammatory response precedes brain inflammation after experimental stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2009 Nov;29(11):1764-8. doi: 10.1038/jcbfm.2009.113. Epub 2009 Aug 5. PubMed PMID: 19654587.

Anrather J, Iadecola C. Inflammation and Stroke: An Overview. *Neurotherapeutics*. 2016 Oct;13(4):661-670. doi: 10.1007/s13311-016-0483-x. Review. PubMed PMID: 27730544; PubMed Central PMCID: PMC5081118.

Shirley R, Ord EN, Work LM. Oxidative Stress and the Use of Antioxidants in Stroke. *Antioxidants (Basel)*. 2014 Jul 3;3(3):472-501. doi:10.3390/antiox3030472. Review. PubMed PMID: 26785066; PubMed Central PMCID: PMC4665418.

Wang R, Ashwal S, Tone B, Tian HR, Badaut J, Rasmussen A, Obenaus A. Albumin reduces blood-brain barrier permeability but does not alter infarct size in a rat model of neonatal stroke. *Pediatr Res*. 2007 Sep;62(3):261-6. PubMed PMID: 17622953.

Matsuo R, Ago T, Hata J, Wakisaka Y, Kuroda J, Kuwashiro T, Kitazono T, Kamouchi M; Fukuoka Stroke Registry Investigators. Plasma C-Reactive Protein and Clinical Outcomes after Acute Ischemic Stroke: A Prospective Observational Study. *PLoS One*. 2016 Jun 3;11(6):e0156790. doi: 10.1371/journal.pone.0156790. eCollection 2016. PubMed PMID: 27258004; PubMed Central PMCID: PMC4892536.

Poole KE, Loveridge N, Barker PJ, Halsall DJ, Rose C, Reeve J, Warburton EA. Reduced vitamin D in acute stroke. *Stroke*. 2006 Jan;37(1):243-5. Epub 2005 Dec 1. PubMed PMID: 16322500.

Koton S, Tanne D, Green MS, Bornstein NM. Mortality and predictors of death 1 month and 3 years after first-ever ischemic stroke: data from the first national acute stroke Israeli survey (NASIS 2004). *Neuroepidemiology*. 2010;34(2):90-6. doi: 10.1159/000264826. Epub 2009 Dec 11. PubMed PMID: 20016218.

Hénon H, Godefroy O, Leys D, Mounier-Vehier F, Lucas C, Rondepierre P, Duhamel A, Pruvo JP. Early predictors of death and disability after acute cerebral ischemic event. *Stroke*. 1995 Mar;26(3):392-8. PubMed PMID: 7886712.

Das S, Chandra Ghosh K, Malhotra M, Yadav U, Sankar Kundu S, Kumar Gangopadhyay P. Short term mortality predictors in acute stroke. *Ann Neurosci*. 2012 Apr;19(2):61-7. doi: 10.5214/ans.0972.7531.12190203. PubMed PMID: 25205967; PubMed Central PMCID: PMC4117043.

Aulin J, Siegbahn A, Hijazi Z, Ezekowitz MD, Andersson U, Connolly SJ, Huber K, Reilly PA, Wallentin L, Oldgren J. Interleukin-6 and C-reactive protein and risk for death and cardiovascular events in patients with atrial fibrillation. *Am Heart J*. 2015 Dec;170(6):1151-60. doi: 10.1016/j.ahj.2015.09.018. Epub 2015 Oct 3. PubMed PMID: 26678637.

Bruunsgaard H, Ladelund S, Pedersen AN, Schroll M, Jørgensen T, Pedersen BK. Predicting death from tumour necrosis factor-alpha and interleukin-6 in 80-year-old people. *Clin Exp Immunol*. 2003 Apr;132(1):24-31. PubMed PMID: 12653832; PubMed Central PMCID: PMC1808682.

Lepper PM, Ott S, Nüesch E, von Eynatten M, Schumann C, Pletz MW, Mealing NM, Welte T, Bauer TT, Suttorp N, Jüni P, Bals R, Rohde G; German Community Acquired Pneumonia Competence Network. Serum glucose levels for predicting death in patients admitted to hospital for community acquired pneumonia: prospective cohort study. *BMJ*. 2012 May 28;344:e3397. doi: 10.1136/bmj.e3397. PubMed PMID: 22645184; PubMed Central PMCID: PMC3362658.

Goodson NJ, Symmons DP, Scott DG, Bunn D, Lunt M, Silman AJ. Baseline levels of C-reactive protein and prediction of death from cardiovascular disease in patients with inflammatory polyarthritis: a ten-year followup study of a primary care-based inception cohort. *Arthritis Rheum*. 2005 Aug;52(8):2293-9. PubMed PMID: 16052597.

Singh-Manoux A, Shipley MJ, Bell JA, Canonico M, Elbaz A, Kivimäki M. Association between inflammatory biomarkers and all-cause, cardiovascular and cancer-related mortality. *CMAJ*. 2017 Mar 13;189(10):E384-E390. doi:10.1503/cmaj.160313. Epub 2016 Nov 28. PubMed PMID: 27895145; PubMed Central PMCID: PMC5359103.

Ridker PM. High-sensitivity C-reactive protein as a predictor of all-cause mortality: implications for research and patient care. *Clin Chem*. 2008 Feb;54(2):234-7. doi: 10.1373/clinchem.2007.099465. PubMed PMID: 18223130.

Proctor MJ, McMillan DC, Horgan PG, Fletcher CD, Talwar D, Morrison DS. Systemic inflammation predicts all-cause mortality: a glasgow inflammation outcome study. *PLoS One*. 2015 Mar 2;10(3):e0116206. doi: 10.1371/journal.pone.0116206. eCollection 2015. PubMed PMID: 25730322; PubMed Central PMCID: PMC4346265.

Huerta S, Bui T, Porral D, Lush S, Cinat M. Predictors of morbidity and mortality in patients with traumatic duodenal injuries. *Am Surg*. 2005 Sep;71(9):763-7. PubMed PMID: 16468514.

Benjamini Y, Hochberg Y (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistics Society Series b (Methodological)* 57:289–300.

- Gröschel K, Ernemann U, Larsen J, Knauth M, Schmidt F, Artschwager J, Kastrup A. Preprocedural C-reactive protein levels predict stroke and death in patients undergoing carotid stenting. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2007 Oct;28(9):1743-6. Epub 2007 Sep 20. PubMed PMID: 17885237.
- Böger CA, Götz A, Stubanus M, Banas B, Deinzer M, Krüger B, Holmer SR, Schmitz G, Riegger GA, Krämer BK. C-reactive protein as predictor of death in end-stage diabetic nephropathy: role of peripheral arterial disease. *Kidney Int*. 2005 Jul;68(1):217-27. PubMed PMID: 15954911.
- Maes M, Anderson G, Kubera M, Berk M. Targeting classical IL-6 signalling or IL-6 trans-signalling in depression? *Expert Opin Ther Targets*. 2014 May;18(5):495-512. doi: 10.1517/14728222.2014.888417. Epub 2014 Feb 19. Review. PubMed PMID: 24548241.
- Hirano T. Interleukin 6 in autoimmune and inflammatory diseases: a personal memoir. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. 2010;86(7):717-30. Review. PubMed PMID: 20689230; PubMed Central PMCID: PMC3066534.
- Jones GW, McLoughlin RM, Hammond VJ, Parker CR, Williams JD, Malhotra R, Scheller J, Williams AS, Rose-John S, Topley N, Jones SA. Loss of CD4+ T cell IL-6R expression during inflammation underlines a role for IL-6 trans signaling in the local maintenance of Th17 cells. *J Immunol*. 2010 Feb 15;184(4):2130-9. doi: 10.4049/jimmunol.0901528. Epub 2010 Jan 18. PubMed PMID: 20083667.
- Dominitzki S, Fantini MC, Neufert C, Nikolaev A, Galle PR, Scheller J, Monteleone G, Rose-John S, Neurath MF, Becker C. Cutting edge: trans-signaling via the soluble IL-6R abrogates the induction of FoxP3 in naive CD4+CD25 T cells. *J Immunol*. 2007 Aug 15;179(4):2041-5. PubMed PMID: 17675459.
- Erta M, Quintana A, Hidalgo J. Interleukin-6, a major cytokine in the central nervous system. *Int J Biol Sci*. 2012;8(9):1254-66. doi: 10.7150/ijbs.4679. Epub 2012 Oct 25. Review. PubMed PMID: 23136554; PubMed Central PMCID: PMC3491449.
- Anderson G, Kubera M, Duda W, Lasoń W, Berk M, Maes M. Increased IL-6 trans-signaling in depression: focus on the tryptophan catabolite pathway, melatonin and neuroprogression. *Pharmacol Rep*. 2013;65(6):1647-54. Review. PubMed PMID: 24553013.
- Maes M, Van de Vyvere J, Vandoolaeghe E, Bril T, Demedts P, Wauters A, Neels H. Alterations in iron metabolism and the erythron in major depression: further evidence for a chronic inflammatory process. *J Affect Disord*. 1996 Sep 9;40(1-2):23-33. PubMed PMID: 8882911.
- Maes M, Van de Vyvere J, Vandoolaeghe E, Bril T, Demedts P, Wauters A, Neels H. Alterations in iron metabolism and the erythron in major depression: further evidence for a chronic inflammatory process. *J Affect Disord*. 1996 Sep 9;40(1-2):23-33. PubMed PMID: 8882911.
- Millerot E, Prigent-Tessier AS, Bertrand NM, Faure PJ, Mossiat CM, Giroud ME, Beley AG, Marie C. Serum ferritin in stroke: a marker of increased body iron stores or stroke severity? *J Cereb Blood Flow Metab*. 2005 Oct;25(10):1386-93. PubMed PMID: 15902198.
- Kell DB, Pretorius E. Serum ferritin is an important inflammatory disease marker, as it is mainly a leakage product from damaged cells. *Metallomics*. 2014 Apr;6(4):748-73. doi: 10.1039/c3mt00347g. PubMed PMID: 24549403.
- Wang W, Knovich MA, Coffman LG, Torti FM, Torti SV. Serum ferritin: Past, present and future. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Aug;1800(8):760-9. doi: 10.1016/j.bbagen.2010.03.011. Epub 2010 Mar 19. Review. PubMed PMID: 20304033; PubMed Central PMCID: PMC2893236.
- 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 Apr 25;54(8):1568-74. PubMed PMID: 10762495.
- Erdemoglu AK, Ozbakir S. Serum ferritin levels and early prognosis of stroke. *Eur J Neurol*. 2002 Nov;9(6):633-7. PubMed PMID: 12453079.

- van der A DL, Grobbee DE, Roest M, Marx JJ, Voorbij HA, van der Schouw YT. Serum ferritin is a risk factor for stroke in postmenopausal women. *Stroke*. 2005 Aug;36(8):1637-41. Epub 2005 Jul 7. PubMed PMID: 16002760.
- Kobune M, Kohgo Y, Kato J, Miyazaki E, Niitsu Y. Interleukin-6 enhances hepatic transferrin uptake and ferritin expression in rats. *Hepatology*. 1994 Jun;19(6):1468-75. PubMed PMID: 8188178.
- Nakagawa H, Tamura T, Mitsuda Y, Goto Y, Kamiya Y, Kondo T, Wakai K, Hamajima N. Inverse correlation between serum interleukin-6 and iron levels among Japanese adults: a cross-sectional study. *BMC Hematol*. 2014 Feb 28;14(1):6. doi: 10.1186/2052-1839-14-6. PubMed PMID: 24576354; PubMed Central PMCID: PMC3974032.
- Morris G, Berk M, Carvalho AF, Maes M, Walker AJ, Puri BK. Why should neuroscientists worry about iron? The emerging role of ferroptosis in the pathophysiology of neurodegenerative diseases. *Behav Brain Res*. 2018 Apr 2;341:154-175. doi: 10.1016/j.bbr.2017.12.036. Epub 2017 Dec 28. Review. PubMed PMID: 29289598.
- Day SM, Duquaine D, Mundada LV, Menon RG, Khan BV, Rajagopalan S, Fay WP. Chronic iron administration increases vascular oxidative stress and accelerates arterial thrombosis. *Circulation*. 2003 May 27;107(20):2601-6. Epub 2003 May 5. PubMed PMID: 12732602.
- Valko M, Jomova K, Rhodes CJ, Kuča K, Musílek K. Redox- and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease. *Arch Toxicol*. 2016 Jan;90(1):1-37. doi: 10.1007/s00204-015-1579-5. Epub 2015 Sep 7. Review. PubMed PMID: 26343967.
- Zielińska-Dawidziak M. Plant ferritin--a source of iron to prevent its deficiency. *Nutrients*. 2015 Feb 12;7(2):1184-201. doi: 10.3390/nu7021184. Review. PubMed PMID: 25685985; PubMed Central PMCID: PMC4344583.
- Lombardi R, Pisano G, Fargion S. Role of Serum Uric Acid and Ferritin in the Development and Progression of NAFLD. *Int J Mol Sci*. 2016 Apr 12;17(4):548. doi: 10.3390/ijms17040548. Review. PubMed PMID: 27077854; PubMed Central PMCID: PMC4849004.
- Knovich MA, Storey JA, Coffman LG, Torti SV, Torti FM. Ferritin for the clinician. *Blood Rev*. 2009 May;23(3):95-104. doi: 10.1016/j.blre.2008.08.001. Epub 2008 Oct 2. Review. PubMed PMID: 18835072; PubMed Central PMCID: PMC2717717.
- Bresgen N, Jaksch H, Lacher H, Ohlenschläger I, Uchida K, Eckl PM. Iron-mediated oxidative stress plays an essential role in ferritin-induced cell death. *Free Radic Biol Med*. 2010 May 15;48(10):1347-57. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.02.019. Epub 2010 Feb 19. PubMed PMID: 20172024.
- Kim K, Cho KH, Im SH, Choi J, Yu J, Kim M. Decrement of Serum Vitamin D Level After Stroke. *Ann Rehabil Med*. 2017 Dec;41(6):944-950. doi: 10.5535/arm.2017.41.6.944. Epub 2017 Dec 28. PubMed PMID: 29354570; PubMed Central PMCID: PMC5773437.
- Sun Q, Pan A, Hu FB, Manson JE, Rexrode KM. 25-Hydroxyvitamin D levels and the risk of stroke: a prospective study and meta-analysis. *Stroke*. 2012 Jun;43(6):1470-7. doi: 10.1161/STROKEAHA.111.636910. Epub 2012 Mar 22. PubMed PMID: 22442173; PubMed Central PMCID: PMC3361562.
- Kienreich K, Grubler M, Tomaschitz A, Schmid J, Verheyen N, Rutters F, Dekker JM, Pilz S. Vitamin D, arterial hypertension & cerebrovascular disease. *Indian J Med Res*. 2013 Apr;137(4):669-79. Review. PubMed PMID: 23703334; PubMed Central PMCID: PMC3724247.
- Gupta A, Prabhakar S, Modi M, Bhadada SK, Lal V, Khurana D. Vitamin D status and risk of ischemic stroke in North Indian patients. *Indian J Endocrinol Metab*. 2014 Sep;18(5):721-5. doi: 10.4103/2230-8210.139241. PubMed PMID: 25285293; PubMed Central PMCID: PMC4171899.
- Sheerah HA, Eshak ES, Cui R, Imano H, Iso H, Tamakoshi A; Japan Collaborative Cohort Study Group. Relationship Between Dietary Vitamin D and Deaths From Stroke and Coronary Heart Disease: The Japan Collaborative Cohort Study. *Stroke*. 2018 Feb;49(2):454-457. doi: 10.1161/STROKEAHA.117.019417. Epub 2018 Jan 8. PubMed PMID: 29311267.

Theodoratou E, Tzoulaki I, Zgaga L, Ioannidis JP. Vitamin D and multiple health outcomes: umbrella review of systematic reviews and meta-analyses of observational studies and randomised trials. *BMJ*. 2014 Apr 1;348:g2035. doi: 10.1136/bmj.g2035. Review. PubMed PMID: 24690624; PubMed Central PMCID: PMC3972415.

Narasimhan S, Balasubramanian P. Role of Vitamin D in the Outcome of Ischemic Stroke- A Randomized Controlled Trial. *J Clin Diagn Res*. 2017 Feb;11(2):CC06-CC10. doi: 10.7860/JCDR/2017/24299.9346. Epub 2017 Feb 1. PubMed PMID: 28384856; PubMed Central PMCID: PMC5376887.

Mozos I, Marginean O. Links between Vitamin D Deficiency and Cardiovascular Diseases. *Biomed Res Int*. 2015;2015:109275. doi: 10.1155/2015/109275. Epub 2015 Apr 27. Review. PubMed PMID: 26000280; PubMed Central PMCID: PMC4427096.

Calton EK, Keane KN, Newsholme P, Soares MJ. The Impact of Vitamin D Levels on Inflammatory Status: A Systematic Review of Immune Cell Studies. *PLoS One*. 2015 Nov 3;10(11):e0141770. doi: 10.1371/journal.pone.0141770. eCollection 2015. Review. PubMed PMID: 26528817; PubMed Central PMCID: PMC4631349.

Berridge MJ. Vitamin D deficiency accelerates ageing and age-related diseases: a novel hypothesis. *J Physiol*. 2017 Nov 15;595(22):6825-6836. doi: 10.1113/JP274887. Epub 2017 Oct 31. PubMed PMID: 28949008; PubMed Central PMCID: PMC5685827.

Zeinab Mokhtari, Azita Hekmatdoost, Mojgan Nourian. Antioxidant efficacy of vitamin D
Journal of Parathyroid Disease 2017;5(1):11-16.

Lawrence DW, Sharma B. A review of the neuroprotective role of vitamin D in traumatic brain injury with implications for supplementation post-concussion. *Brain Inj*. 2016;30(8):960-8. doi: 10.3109/02699052.2016.1147081. Epub 2016 May 16. Review. PubMed PMID: 27185224.

Wrzosek M, Łukaszkiwicz J, Wrzosek M, Jakubczyk A, Matsumoto H, Piątkiewicz P, Radziwoń-Zaleska M, Wojnar M, Nowicka G. Vitamin D and the central nervous system. *Pharmacol Rep*. 2013;65(2):271-8. Review. PubMed PMID: 23744412.

Sud M, Wang X, Austin PC, Lipscombe LL, Newton GE, Tu JV, Vasani RS, Lee DS. Presentation blood glucose and death, hospitalization, and future diabetes risk in patients with acute heart failure syndromes. *Eur Heart J*. 2015 Apr 14;36(15):924-31. doi: 10.1093/eurheartj/ehu462. Epub 2015 Jan 8. PubMed PMID: 25572328.

Ginsberg MD, Welsh FA, Budd WW. Deleterious effect of glucose pretreatment on recovery from diffuse cerebral ischemia in the cat. I. Local cerebral blood flow and glucose utilization. *Stroke*. 1980 Jul-Aug;11(4):347-54. PubMed PMID: 7414662.

Pulsinelli WA, Waldman S, Rawlinson D, Plum F. Moderate hyperglycemia augments ischemic brain damage: a neuropathologic study in the rat. *Neurology*. 1982 Nov;32(11):1239-46. PubMed PMID: 6890157.

Song EC, Chu K, Jeong SW, Jung KH, Kim SH, Kim M, Yoon BW. Hyperglycemia exacerbates brain edema and perihematomal cell death after intracerebral hemorrhage. *Stroke*. 2003 Sep;34(9):2215-20. Epub 2003 Aug 7. PubMed PMID:12907821.

Tomlinson DR, Gardiner NJ. Glucose neurotoxicity. *Nat Rev Neurosci*. 2008 Jan;9(1):36-45. Review. PubMed PMID: 18094705.

Acharjee S, Boden WE, Hartigan PM, Teo KK, Maron DJ, Sedlis SP, Kostuk W, Spertus JA, Dada M, Chaitman BR, Mancini GB, Weintraub WS. Low levels of high-density lipoprotein cholesterol and increased risk of cardiovascular events in stable ischemic heart disease patients: A post-hoc analysis from the COURAGE Trial (Clinical Outcomes Utilizing Revascularization and Aggressive Drug Evaluation). *J Am Coll Cardiol*. 2013 Nov 12;62(20):1826-33. doi:10.1016/j.jacc.2013.07.051. Epub 2013 Aug 21. PubMed PMID: 23973693; PubMed Central PMCID: PMC5661970.

Gugliucci A, Menini T (2015) Paraoxonase 1 and HDL maturation. *Clin Chim Acta* 439:5-13.

- Efrat M, Aviram M (2010) Paraoxonase 1 interactions with HDL, antioxidants and macrophages regulate atherogenesis - a protective role for HDL phospholipids. *Adv Exp Med Biol* 660:153-166.
- Watson AD, Berliner JA, Hama SY, La Du BN, Faull KF, Fogelman AM, Navab M (1995) Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase. Inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest* 96(6):2882-2891.
- Mackness M, Mackness B (2015) Human paraoxonase-1 (PON1): Gene structure and expression, promiscuous activities and multiple physiological roles. *Gene* 567(1):12-21.
- Costa LG, Cole TB, Furlong CE (2005) Paraoxonase (PON1): from toxicology to cardiovascular medicine. *Acta Biomed* 76 Suppl 2:50-57.
- Gomaschi M, Basilico N, Sisto F, Taramelli D, Eligini S, Colli S, Sirtori CR, Franceschini G, Calabresi L. High-density lipoproteins attenuate interleukin-6 production in endothelial cells exposed to pro-inflammatory stimuli. *Biochim Biophys Acta*. 2005 Sep 15;1736(2):136-43. PubMed PMID: 16135414.
- Van Hunsel F, Wauters A, Vandoolaeghe E, Neels H, Demedts P, Maes M. Lower total serum protein, albumin, and beta- and gamma-globulin in major and treatment-resistant depression: effects of antidepressant treatments. *Psychiatry Res*. 1996 Dec 20;65(3):159-69. PubMed PMID: 9029664.
- Maes M, Fišar Z, Medina M, Scapagnini G, Nowak G, Berk M. New drug targets in depression: inflammatory, cell-mediated immune, oxidative and nitrosative stress, mitochondrial, antioxidant, and neuroprogressive pathways. And new drug candidates--Nrf2 activators and GSK-3 inhibitors. *Inflammopharmacology*. 2012 Jun;20(3):127-50. doi: 10.1007/s10787-011-0111-7. Epub 2012 Jan 24. Review. PubMed PMID: 22271002.
- de Melo LGP, Nunes SOV, Anderson G, Vargas HO, Barbosa DS, Galecki P, Carvalho AF, Maes M. Shared metabolic and immune-inflammatory, oxidative and nitrosative stress pathways in the metabolic syndrome and mood disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2017 Aug 1;78:34-50. doi: 10.1016/j.pnpbp.2017.04.027. Epub 2017 Apr 22. Review. PubMed PMID: 28438472.

Table 1 Demographic and biomarkers data in ischemic stroke patients and healthy controls. Patients were divided into stroke survivors versus non-survivors (three months after stroke onset)

Characteristics	Controls ^A (n=176)	Survivors ^B (n=91)	Non-survivors ^C (n=54)	F/X ²	df	p value
Age (years)	63.2 (11.3) ^C	65.9 (14.0) ^C	72.3 (2.0) ^{A,B}	12.62	2/318	<0.001
Sex						
Male	49 (27.84%) ^{B,C}	58 (63.73%) ^A	27 (50.00%) ^A	33.60	2	<0.001
Female	127 (72.16%)	33 (36.27%)	27 (50.00%)			
Ethnicity						
Caucasian	129 (73.3)	75 (82.4)	43 (79.6)	2.82	2	0.244
Non-Caucasian	47 (26.7)	16 (17.6)	11 (20.4)			
BMI (kg/m ²)	26.79 (4.28)	26.31 (5.48)	26.49 (5.40)	0.29	2/285	0.749
Hypertension	77 (45.56%) ^{B,C}	75 (82.42%) ^A	49 (92.45%) ^A	57.1	2	<0.001
SBP (mmHg)	122.5 (14.9) ^{B,C}	146.4 (26.1) ^A	151.9 (32.2) ^A	50.04	2/288	<0.001
DBP (mmHg)	79.1 (12.1) ^{B,C}	87.1 (20.6) ^A	91.0 (17.6) ^A	13.62	2/288	<0.001
DM	36 (20.45%) ^{B,C}	36 (39.56%) ^A	23 (42.59%) ^A	15.77	2	<0.001
Dyslipidemia	68 (40.23%)	39 (57.14%)	24 (44.44%)	0.48	2	0.788
Smoking	12 (6.82%) ^{B,C}	19 (20.88%) ^A	12 (22.22%) ^A	14.82	2	0.001
Previous Stroke	-	34 (37.39%)	24 (44.44%)	0.96	1	0.328
mRS	-	3.41 (1.24) ^C	4.48 (1.06) ^B	27.62	1/141	<0.001
CL-LOOH (cpm)	16556 (11484) ^{B,C}	25672 (18515) ^A	31077 (34926) ^A	12.89	2/284	<0.001
INFLAM index1	-1.66 (2.11) ^{B,C}	+1.05 (2.28) ^{A,C}	+3.13 (2.60) ^{A,B}	82.47	2/224	<0.001
INFLAM index2	-2.77 (2.46) ^{B,C}	+1.62 (3.27) ^{A,C}	+4.67 (3.84) ^{A,B}	107.49	2/212	<0.001
Insulin (IU/L)	10.7 (7.3) ^{B,C}	27.7 (40.4) ^A	19.6 (18.7) ^A	15.62	2/297	<0.001
Glucose (mg/dL)	98.1 (29.2) ^{B,C}	133.4 (53.6) ^{A,C}	168.0 (79.2) ^{A,B}	47.72	2/308	<0.001
HDL (mg/dL)	54.9 (15.3) ^{B,C}	43.7 (16.8) ^A	40.1 (12.9) ^A	27.29	2/315	<0.001

The continuous variables were expressed as mean (SD); categorical variables were expressed as number (n) and percentage (%). BMI: body mass index; SBP: systolic blood pressure; DBP: diastolic blood pressure; DM: diabetes mellitus; mRS: modified Rankin Scale; CL-LOOH: lipid hydroperoxide-initiated chemiluminescence; HDL: high density lipoprotein cholesterol; df: degree of freedom; cpm: counts per minute

INFLAM index1: computed as z transformation of C-reactive protein with high sensitivity method (z hsCRP) + z interleukin-6 + z ferritin + z erythrocyte sedimentation rate + z number of peripheral leukocytes (expressed in z scores); INFLAM index2: INFLAM index1 – z 25(hydroxyvitamin D) - z iron - z total serum protein (expressed in z scores).

^{A,B,C}: results of pairwise protected post-hoc analyses (all p<0.05)

Table 2 Results of multivariate GLM analysis with the inflammatory indices, glucose, insulin, high-density lipoprotein (HDL)-cholesterol and lipid hydroperoxides (CL-LOOH) as dependent variables

Test	Dependent variables	Explanatory variables	F	df	p
Multivariate	INFLAM index1	Diagnosis	16.95	12/312	<0.001
	INFLAM index2	Sex	3.79	6/156	0.001
	HDL-cholesterol ,	Smoking	1.16	6/156	0.333
	Glucose, Insulin,	Age	2.89	6/156	0.011
	CL-LOOH	BMI	4.87	6/156	<0.001
Between subject effects	INFLAM index1	Diagnosis	45.40	2/161	<0.001
	INFLAM index2	Diagnosis	68.89	2/161	<0.001
		Sex	6.52	1/161	0.012
		Age	4.70	1/161	0.032
		BMI	4.75	1/161	0.031
	HDL-cholesterol	Diagnosis	9.68	2/161	<0.001
		Sex	11.51	1/161	0.001
		Age	6.56	1/161	0.011
	Glucose	Diagnosis	31.15	2/161	<0.001
	Insulin	Diagnosis	14.21	2/161	<0.001
BMI		17.72	2/161	<0.001	
CL-LOOH	Diagnosis	7.52	2/161	0.001	

Model-generated estimated marginal means (\pm SE and expressed as z-values as obtained by the GLM analysis presented in Table 2) in healthy controls and stroke victims divided into survivors and non-survivors three months after stroke onset

Variables	Controls ^A	Survivors ^B	Non-survivors ^C
INFLAM index1	-1.57 (0.35) ^{B,C}	+1.25 (0.37) ^{A,C}	+2.61 (0.49) ^{A,B}
INFLAM index2	-2.70 (0.45) ^{B,C}	+1.90 (0.48) ^{A,C}	+3.87 (0.63) ^{A,B}
z Glucose	-0.39 (0.13) ^{B,C}	+0.35 (0.14) ^{A,C}	+0.98 (0.18) ^{A,B}
z Insulin	-0.27 (0.14) ^B	+0.59 (0.15) ^{A,C}	+0.04 (0.20) ^B
z HDL-cholesterol	-0.03 (0.14) ^{B,C}	-0.38 (0.15) ^{A,C}	-0.88 (0.19) ^{A,B}
z CL-LOOH	-0.16 (0.14) ^{B,C}	+0.44 (0.15) ^A	+0.36 (0.20) ^A

INFLAM index1: computed as z transformation of C-reactive protein with high sensitivity method (z hsCRP) + z interleukin-6 + z ferritin + z erythrocyte sedimentation rate + z number of peripheral leukocytes

INFLAM index2: INFLAM index1 – z 25(hydroxyvitamin D) - z iron - z total serum protein;

GLM: General linear model; df: degree of freedom; HDL: high density lipoprotein; CL-LOOH: lipid hydroperoxide-initiated chemiluminescence; BMI: body mass index; 25(OH)D: 25 hydroxyvitamin D

^{A,B,C}: results of pairwise protected post-hoc analyses (all p<0.05)

Table 3 Results of multivariate GLM analyses with the 8 immune-inflammatory biomarkers as dependent variables

Test	Dependent variables	Explanatory variables	F	df	p value
Multivariate	While blood cells, IL-6, hsCRP, Ferritin, ESR, 25(OH)D, TSP, Iron	Diagnosis	9.80	16/354	<0.001
		Sex	3.20	8/177	0.002
		Smoking	2.31	8/177	0.022
		Age	2.11	8/177	0.037
		BMI	1.45	8/177	0.180
Univariate	IL-6	Diagnosis	27.92	2/263	<0.001
		Age (+)	13.68	1/263	<0.001
	hsCRP	Diagnosis	55.43	2/275	<0.001
		BMI (+)	5.49	1/275	0.020
	ESR	Diagnosis	4.88	2/216	0.008
		BMI (+)	5.69	1/216	0.018
	Ferritin	Diagnosis	8.74	2/254	<0.001
		Sex (M>F)	4.52	2/254	0.034
	Iron	Diagnosis	24.99	2/275	<0.001
		While blood cells	Diagnosis	37.29	2/232
	25(OH)D	Diagnosis	17.52	2/273	<0.001
	Total serum protein	Diagnosis	4.89	2/228	0.008

Model-generated estimated marginal means (\pm SE and expressed as z-values as obtained by the GLM analysis presented in Table 3) in healthy controls and stroke victims divided into survivors and non-survivors three months after stroke onset

Variables	Controls ^A	Survivors ^B	Non-survivors ^C
IL-6 (ng/mL)	-0.38 (0.10) ^{B,C}	+0.27 (0.11) ^{A,C}	+0.74 (0.15) ^{A,B}
hsCRP (mg/L)	-0.51 (0.09) ^{B,C}	+0.38 (0.10) ^{A,C}	+0.83 (0.13) ^{A,B}
ESR (mm/h)	-0.12 (0.12) ^C	+0.14 (0.13)	+0.45 (0.17) ^A
Ferritin (ng/mL)	-0.28 (0.10) ^C	-0.13 (0.11) ^C	+0.38 (0.14) ^{A,B}
Iron (μ g/dL)	+0.44 (0.10) ^{B,C}	-0.42 (0.12) ^A	-0.33 (0.16) ^A
While blood cells (cells/mm ³)	-0.56 (0.11) ^{B,C}	+0.34 (0.11) ^A	+0.64 (0.14) ^A
25(OH)D (ng/mL)	+0.42 (0.11) ^{B,C}	-0.16 (0.12) ^{A,C}	-0.54 (0.17) ^{A,B}
Total serum protein (g/dL)	+0.16 (0.10) ^C	-0.07 (0.11)	-0.36 (0.15) ^A

All data are shown in z scores obtained by z transformations

^{A,B,C}: results of pairwise protected post-hoc analyses (all $p < 0.05$)

GLM: General linear model; df: degree of freedom; IL: interleukin; hsCRP C-reactive protein with high sensitivity method (hsCRP); ESR: erythrocyte sedimentation rate; BMI: body mass index; M: male; F: female; 25(OH)D: 25-hydroxyvitamin D, TSP: total serum protein

Table 4 Results of multivariate GLM analysis with inflammation indices, high density lipoprotein (HDL)-cholesterol, insulin, glucose and lipid hydroperoxides (CL-LOOH) as dependent variables and diagnosis (post-stroke death versus all other subjects) as primary explanatory variable, while adjusting for confounding variables

Type test	Dependent Variables	Explanatory Variables	F	df	p value
Multivariate	INFLAM index1,	Diagnosis	12.25	6/157	<0.001
	INFLAM index2,	Sex	4.31	6/157	<0.001
	HDL-cholesterol ,	Smoking	1.24	6/157	0.290
	Insulin, Glucose,	Age	3.05	6/157	0.008
	CL-LOOH	BMI	3.05	6/157	0.008
Between subject effects	INFLAM index1	Diagnosis	32.04	1/162	<0.001
	INFLAM index2	Diagnosis	40.33	1/162	<0.001
	HDL-cholesterol	Diagnosis	19.41	1/162	<0.001
	Insulin	Diagnosis	0.03	1/162	0.868
	Glucose	Diagnosis	32.60	1/162	<0.001
	CL-LOOH	Diagnosis	1.91	1/162	0.169

Model-generated estimated marginal means (\pm SE and expressed as z-values as obtained by the GLM analysis presented in Table 4) in stroke victims divided into survivors and non-survivors three months after stroke onset

Variables	Controls + Survivors	Non-survivors
INFLAM index1	-0.28 (0.34)	+2.77 (0.55)
INFLAM index2	+0.60 (0.47)	+4.14 (0.77)
zHDL-cholesterol	-0.15 (0.11)	-0.95 (0.19)
z Glucose	-0.06 (0.12)	+1.02 (0.19)

INFLAM index1: computed as z transformation of C-reactive protein with high sensitivity method (z hsCRP) + zInterleukin-6 + z Ferritin + z Erythorocyte sedimentation rate + z number of peripheral leukocytes;

INFLAM index2: Inflam index1 – z 25(OH) vitamin D - z iron - z total serum protein;

GLM: General linear model; HDL: high density lipoprotein; BMI: body mass index; CL-LOOH: lipid hydroperoxides; 25(OH)D: 25 hydroxyvitamin D

Table 5 Results of binary regression analyses with post stroke death as dependent variable

Test	Explanatoryvariables	Wald	df	p value	OR	CI 95%
Regression #1	Glucose	10.25	1	0.001	2.05	1.32-3.17
	Ferritin	3.89	1	0.049	1.60	1.00-2.57
	IL-6	18.71	1	<0.001	2.97	1.81-4.86
	CL-LOOH	4.89	1	0.027	1.73	1.06-2.80
	25(OH)D	4.62	1	0.032	0.63	0.41-0.96
Regression 2#	INFLAM index1	6.10	1	0.013	1.22	1.04-1.43
	mRS basal	11.38	1	0.001	2.49	1.46-4.23

OR: odds ratio; CI: confidence interval;

IL: interleukin; 25(OH)D: 25-hydroxyvitamin D; CL-LOOH: lipid hydroperoxides

INFLAM index1: computed as z transformation of C-reactive protein with high sensitivity method (z hsCRP) + z Interleukin-6 + z Ferritin + z Erythrocyte sedimentation rate + z number of peripheral leukocytes; mRS: modified Rankin Scale;

Regression #1: performed in patients and controls

Regression #2: performed in patients

Table 6 Area under the receiver operating characteristics (AUC ROC) curves

Variables	AUCROC	SE	p value	95% CI	Cut-off	Sens (%)	Spec (%)
INFLAM index1	0.851	0.030	<0.001	0.792-0.910	>1.93	65.9	85.3
INFLAM index2	0.870	0.030	<0.001	0.812-0.928	>2.91	71.7	87.1
IL-6 (ng/mL)	0.775	0.037	<0.001	0.703-0.848	>20.40	51.4	84.6
hsCRP (mg/L)	0.776	0.040	<0.001	0.698-0.853	>13.50	48.6	89.3
WBC (cells/mm ³)	0.756	0.042	<0.001	0.675-0.838	>10.570	50.0	90.0
ESR (mm/h)	0.709	0.045	<0.001	0.621-0.790	>22.50	45.5	81.8
Glucose (mg/dL)	0.767	0.042	<0.001	0.685-0.849	>142.5	48.6	88.6
25(OH)D (ng/mL)	0.717	0.043	<0.001	0.633-0.802	<18.90	48.6	85.2
TSP (g/dL)	0.749	0.042	<0.001	0.667-0.831	<6.68	45.5	86.6

SE: standard error; CI: confidence interval; Sens: sensibility; Spec: specificity;

INFLAM index1: computed as z transformation of C-reactive protein with high sensitivity method (z hsCRP) + z interleukin-6 + z ferritin + z erythrocyte sedimentation rate + z white blood cell counts; INFLAM index2: INFLAM index1 – z 25 hydroxyvitamin D - z iron - z total serum protein;

IL: interleukin; hsCRP: C-reactive protein with high sensitivity method; WBC: white blood cell count; ESR: erythrocyte sedimentation rate; 25(OH)D: 25-hydroxyvitamin D, TSP: total serum protein

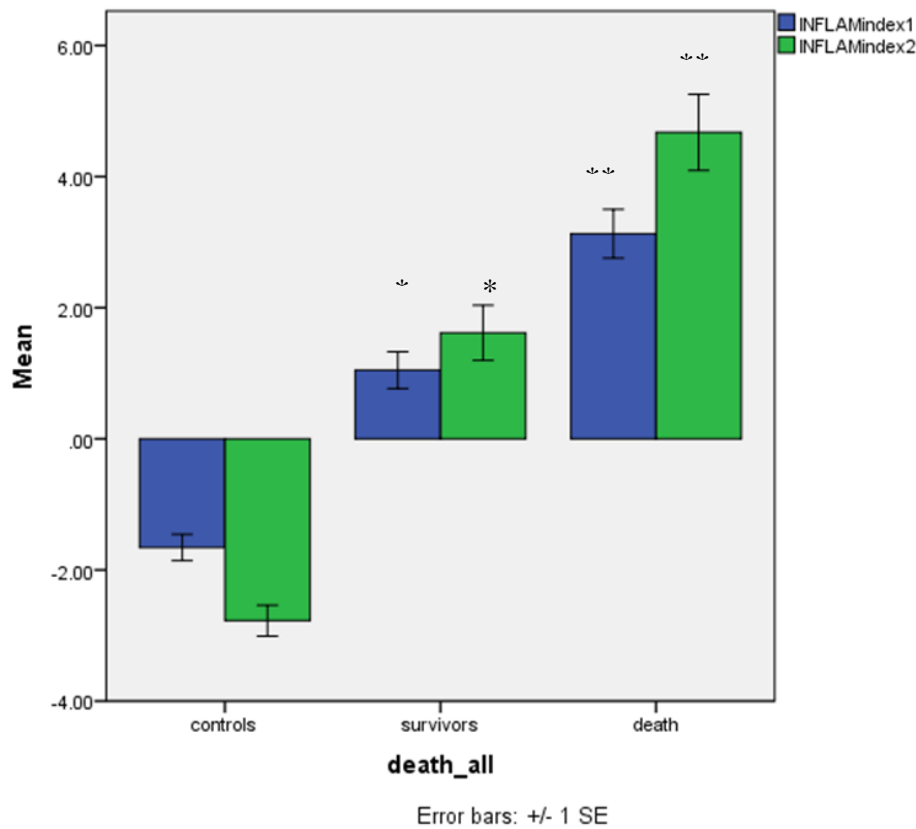


Fig 1 The mean values of the INFLAM index 1 and INFLAM index2 among the three study groups: healthy controls, and those survivors and non-survivors (death) patients after three-month follow-up the acute ischemic stroke. Post-hoc analyses performed on the model-generated estimated marginal mean values showed significant differences among the three study groups, with INFLAM index1 and INFLAM index2 increasing from controls to stroke survivors to stroke non-survivors.

INFLAM index 1 was computed as z transformation of inflammatory variables, such as C reactive protein evaluated with high sensitivity method (z hsCRP) + interleukin 6 (z IL-6) + z ferritin + erythrocyte sedimentation rate (z ESR) + white blood cell count (z WBC), expressed in z scores.

INFLAM index 2 was computed as INFLAM index 1 – z 25-hydroxyvitamin D [z 25(OH) D] - z iron - z total serum protein z (TSP), expressed in z scores. SE: standard error.

The results of pairwise protected post-hoc analyses.

* survivors *versus* controls: $p < 0.001$;

** non-survivors (death) *versus* controls and *versus* survivors: $p < 0.001$.

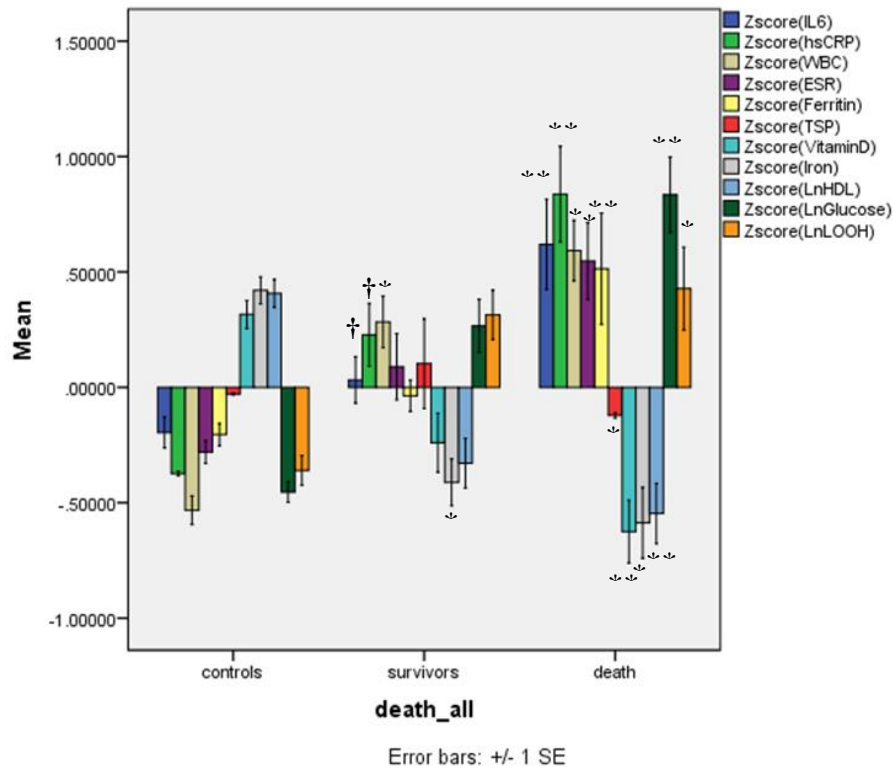


Fig 2 The z transformed values of the 11 biomarkers in the three study groups: healthy controls and those survivors, and non-survivors (death) patients after three-month follow-up of acute ischemic stroke.

IL-6: Interleukin 6; hsCRP: C reactive protein evaluated with high sensitivity method; WBC: White blood cell count; ESR: erythrocyte sedimentation rate; TSP: total serum protein; LnHDL: Logarithmic transformation of HDL-cholesterol values; LnGlucose: Logarithmic transformation of glucose; LnLOOH: Logarithmic transformation of CL-LOOH values; SE: standard error. The results of pairwise protected post-hoc analyses.

*: non-survivors (death) *versus* controls ($p < 0.05$)

** : non-survivors (death) *versus* survivors and *versus* controls ($p < 0.05$)

†: survivors *versus* controls and *versus* non-survivors (death) ($p < 0.05$)

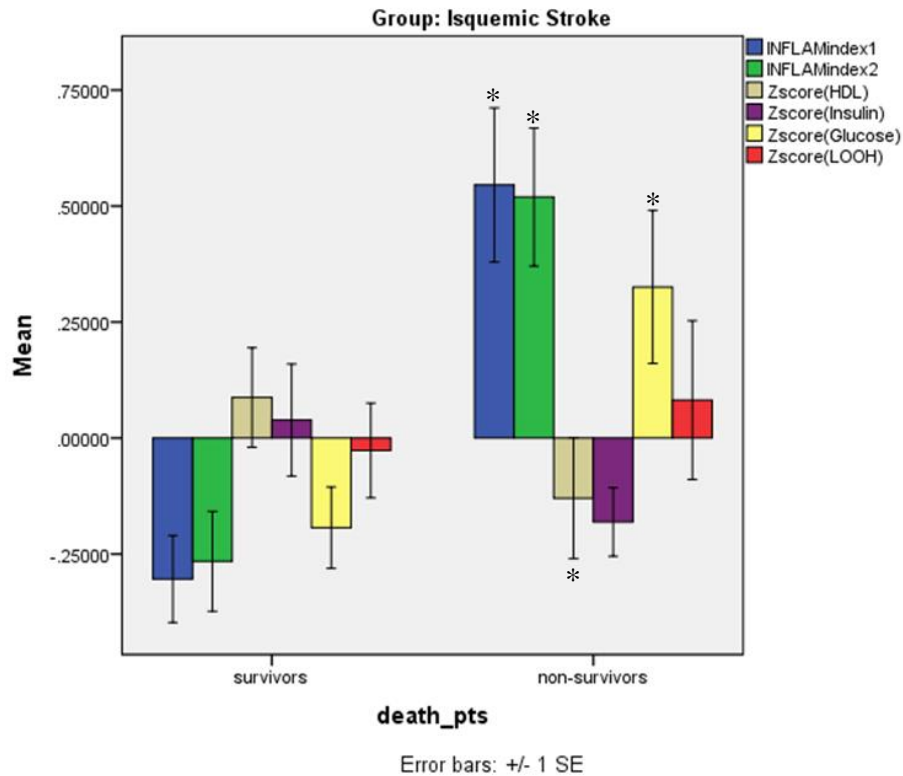


Fig 3 The z transformed values of both INFLAM index 1 and INFLAM index2, HDL-cholesterol, insulin, glucose and CL-LOOH in both acute ischemic stroke patient groups: survivors and non-survivors after three-month follow-up. INFLAM index 1 was computed as z transformation of inflammatory variables, such as C reactive protein evaluated with high sensitivity method (z hsCRP) + interleukin 6 (z IL-6) + z ferritin + erythrocyte sedimentation rate (z ESR) + white blood cell count (z WBC), expressed in z scores.

INFLAM index 2 was computed as INFLAM index 1 – z 25-hydroxyvitamin D [z 25(OH) D] - z iron - z total serum protein z (TSP), expressed in z scores. SE: standard error. The differences in INFLAM index1 (p=0.004), INFLAM index2 (p=0.024), glucose (p=0.004) and HDL-cholesterol (p=0.031) were significant.

The results of pairwise protected post-hoc analyses.

*: non-survivors (death) *versus* survivors (p<0.05)

6 CONCLUSÕES

O presente estudo permitiu as seguintes conclusões:

- Em relação à idade dos indivíduos analisados, os pacientes que morreram após o AVEI eram mais velhos comparados aos que sobreviveram e ao grupo controle;
- Entre os pacientes com AVEI, o déficit neurológico avaliado no momento da admissão foi significativamente maior nos pacientes que morreram comparados aos que sobreviveram;
- Pacientes não sobreviventes apresentaram significamente maiores níveis basais de IL-6, usPCR, ferritina e glicose e menores níveis de HDL-colesterol e 25 (OH) D do que os sobreviventes.
- Os não sobreviventes apresentaram significamente maiores níveis de VHS e menores níveis séricos de proteínas totais do que os controles, enquanto os sobreviventes ocuparam uma posição intermediária.
- As análises de regressão binária nos pacientes não sobreviventes mostraram que os níveis de IL-6, glicose, ferritina, CL-LOOH e 25 (OH) D predizeram significativamente a morte em pacientes com AVEI. O melhor preditor foi IL-6 seguido dos níveis de glicose.
- Índice inflamatório 1 e o mRS predizeram significamente a morte em pacientes com AVEI;
- Nas análises da curva ROC com todos os biomarcadores como variáveis discriminatórias, o índice inflamatório 1 e 2 mostraram os melhores desempenhos de diagnóstico para prever morte após AVEI, com uma AUC igual a 0,870 e 0,851, respectivamente;
- A usPCR e IL-6, com uma AUC igual a 0,776 e 0,775, respectivamente mostraram resultados satisfatórios com uma sensibilidade de 48,6% e especificidade de 89,3% para usPCR > 13,5 mg/L; e uma sensibilidade de 51,4% e especificidade de 84,6 % para IL-6 > 20,4 pg/mL.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados desse estudo demonstraram que a ativação das vias inflamatórias e metabólicas estão associadas criticamente com altas taxas de mortalidade após AVEI.

A determinação de marcadores inflamatórios e metabólicos como preditores de morte em pacientes com AVEI agudo é extremamente relevante, com abertura para novas opiniões terapêuticas no tratamento desses pacientes.

Esses dados poderiam ajudar no desenvolvimento de novas ferramentas de biomarcadores, que prevêm a morte pós-AVEI, e demonstraram que as vias de sinalização da IL-6, juntamente com os desequilíbrios redox, poderiam ser novos alvos de drogas na prevenção da morte após o AVEI.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, H. P. et al. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. **Stroke; a journal of cerebral circulation**, v. 24, n. 1, p. 35–41, Jan. 1993.
- 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.
- ADIBHATLA, R. M. ; HATCHER, J.F. Altered lipid metabolism in brain injury and disorders. **Subcell Biochem**, v. 49, p. 241-268, 2008.
- ALFIERI, D.F. **Associação entre o status de vitamina D e marcadores inflamatórios em pacientes com Acidente Vascular Encefálico Isquêmico Agudo**. 2016. 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.
- ALMEIDA, A.G.; DAL PIZZOL, A.; VALLER, L. Acidente vascular cerebral isquêmico agudo: fatores de risco. In: Nasi, LA (org). **Rotinas em Unidade Vascular**. Porto Alegre: Ed. Artmed, 2012. p. 287-295.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of medical care in diabetes--2014. **Diabetes care**, v. 37 Suppl 1, n. Supplement_1, p. S14–80, 1 Jan. 2014.
- AMERICAN HEART ASSOCIATION. **Suporte Avançado de vida em cardiologia**. p.10-1 a 10-4. Dallas, 1997.
- APPELROS, P.; STEGMAYR, B.; TERÉNT, A. Sex differences in stroke epidemiology. A systematic review. **Stroke**, Dallas, v. 40, p. 1082-1090, 2009.
- AVE Isquêmico. <http://saudeexperts.com.br/avc-acidente-vascular-cerebral>. Acesso em 28.12.2017.
- AVE Hemorrágico: <http://saudeexperts.com.br/avc-acidente-vascular-cerebral>. Acesso em 28.12.2017.
- BACKES, F. N. **Biomarcadores séricos e prognóstico no Acidente Vascular Cerebral**. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas). Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.
- BENJAMIN, E.J. et al. Heart disease and stroke statistics--2017 update: a report from the American Heart Association. **Circulation**, v. 135, march 7, 2017.
- BONITA, R.; BEAGLEHOLE, R. Recovery of motor function after stroke. **Stroke**, v. 19: 1497-1500, 1988.
- BOTELHO, T.S. et al. Epidemiologia do acidente vascular cerebral no Brasil. **Temas em Saúde**. João Pessoa, v. 16, n 2, p. 361-377, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. (2004). Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução Diretoria Colegiada (RDC) no. 153, 14 de Junho, 2004**. Diário Oficial de 24 de junho de 2004, Brasil.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. **Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. Diretrizes de atenção à reabilitação da pessoa com acidente vascular cerebral / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Ações Programáticas Estratégicas**. Brasília: Ministério da Saúde, 2016.

BRONDUM-JACOBSEN, P. et al. 25-Hydroxyvitamin D and Symptomatic Ischemic Stroke: na original study and meta-analysis. **Annals of Neurology**, Copenhagen, v. 73, p. 38-47, 2012.

BROTT, T.; ADAMS, H.P. JR.; OLINGER, C.P. Measurement of factue cerebral infarction: a clinical examination scale. **Stroke**, 1989; 20:864-870.

CABRAL, N. L. Epidemiologia e impacto da doença cerebrovascular no Brasil e no mundo. **ComCiência**, Campinas, n. 109, 2009.

CASTELLANOS, M. et al. Inflammation-mediated damage in progressing lacunar infarctions. **Stroke**, 2002; 33:982-987.

CHAMORO, A. Role of inflammation in stroke and atherothrombosis. **Cerebrovasc Dis**. 2004;17:1-5.

CHENG, B. et al. Influence of Stroke Infarct Location on Functional Outcome Measured by the Modified Rankin Scale. **Stroke**, Dallas, v. 45, p. 1695-1702, 2014.

CHO, S. W. et al. Parâmetros Hemorreológicos e Glicêmicos e HDL- Colesterol para a Predição de Eventos Cardiovasculares. **Arq Bras Cardiol**, São Paulo, v. 106 (1), p. 56-61, 2016.

CHUNG, J. W. et al. Trial of ORG 10172 in Acute Stroke Treatment (TOAST) Classification and Vascular Territory of Ischemic Stroke Lesions Diagnosed by Diffusion-Weighted Imaging. **Journal of the American Heart Association**, Seul, 2014.

COHEN, J. Inhibiting interleukin-6 (IL-6): The key to health, successful aging and vitality. <https://www.selfhacked.com/blog/interleukin-6/> acessado em 16.02.2017.

CORREIA, L. C. L. et al. Determinantes do valor da proteína C-reativa em indivíduos de nível sócio-econômico muito baixo. **Arq Bras Cardiol**, São Paulo, v. 94 (2), 2010.

DAUBAIL, B. et al. Serum 25-hydroxyvitamin D predicts severity and prognosis in stroke patients. **European Journl of Neurology**, Dijon, v. 20, p. 57-61, 2013.

DÁVALOS A. et al. Body iron stores and early neurologic deterioration in acute cerebral infarction. **Neurology**; 54:1568-1574. 2000.

DINAPOLI, M. et al. 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.

DOMINGUES, R. H. M. et al. FM. Síntese de (*E*)-dimetoxi-estilbenos com atividade primitiva a aterosclerose *in vitro*. **Revista de Ciência Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v. 38, 2017.

FASSBENDER K.; ROSSOL S.; KAMMER T. et al. Proinflammatory cytokines in serum of patients with acute cerebral ischaemia: kinetics of secretion and relation to the extent of brain damage and outcome of disease. **J NeurolSci**; 22:135–9, 1994.

FERNANDEZ, L.L. et al. Iron and neurodegeneration. **Scientia Medica**, Porto Alegre, v. 17, n. 4, p. 218-224, out./dez. 2007.

FROYSSHOV, H.M. et al. Elevated inflammatory markers predict mortality in long-term ischemic stroke-survivors: a population-based prospective study. **Aging Clin Exp Res**, v. 29, n.3, p. 379-385, 2017.

GARCIA, J. H.; KAMIJYO, Y. Cerebral infarction. Evolution of histopathological changes after occlusion of a middle cerebral artery in primates. **Journal of neuropathology and experimental neurology**, v. 33, n. 3, p. 408–21, Jul. 1974.

GILES, M. F.; ROTHWELL, P. M. Measuring the prevalence of stroke. **Neuroepidemiology**.30:205-6, 2008.

GONZALES-FLECHA, B.G.; LLESUY, S.; BOVERIS, A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. **Free Rad Biol Med**, v.10, p. 93-100, 1991.

GRAW, A.J. et al. Leukocyte count as an independent predictor of recurrent ischemic events. **Stroke**; 35:1147-1152, 2004.

GRUNDY, S. M. et al. Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III Guidelines. **JAAC**, Dallas, v. 44, p. 720-732, 2004.

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

HANDEFORTH, C et al. Cancer treatment and bone health. **Springer**. 2017.

HERMANN O. et al Regulation of body temperature and neuroprotection by endogenous interleukin-6 in cerebral ischemia. **J Cereb Blood Flow Metab**; 23:406-415, 2003.

HOLICK, M. Vitamin D deficiency. **The New England journal of medicine**, v. 357, n. 3, p. 266–81, 2007.

HUANG, Y. et al. High-sensitivity C-Reactive Protein is a strong factor of death after acute ischemic stroke among Chinese. **CNS neurosciences & therapeutics**, Beijing, 2012.

JAMES, P. A. et al. 2014 evidence-based guideline for the management of high blood pressure in adults: report from the panel members appointed to the Eighth Joint National Committee (JNC 8). **JAMA: the journal of the American Medical Association**, v. 311, n. 5, p. 507–20, 5 Feb. 2014.

JIA, G.; WHALEY-CONNELL, A.; SOWERS, J.R. Diabetic cardiomyopathy: a hyperglycaemia and insulin-resistance-induced heart disease. **Springer-Verlag**, Columbia, 2017.

LEHMANN, M. F. **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. 141 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde). Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

LIMA, M. J. R. et al. Análise dos casos de Acidente Vascular Encefálico em hipertensos e diabéticos de uma área de vulnerabilidade social do nordeste brasileiro. In: MOREIRA, T. M. M.; PESSOA, V. L. M. P.; SOARES, M. **Promoção de Saúde Cardiovascular**. Fortaleza. Ed. UECE, 2015. p. 274-300.

MARQUES, C.D.L. et al. A importância da vitamina D nas doenças imunes. **Revista Brasileira de Reumatologia**. São Paulo, v.50, n. 1, 2010.

MAUREIRA, A. C. **Papel de inibidores da síntese e absorção do colesterol na modulação de biomarcadores de inflamação de adesão celular *in vitro* e *in vivo***. 2013. Tese (Doutorado Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas). Faculdade de Ciência Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

MILLER, L. L. et al. Iron-independent induction of ferritin H chain by tumor necrosis factor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Vol. 88, pp. 4946-4950, June 1991.

MINAME, M. H.; SANTOS, R. D. Uso da proteína C reativa na prevenção da aterosclerose: entre Jupiter e Marte. **Rev. Assoc. Med. Bras.** São Paulo, v.55, n. 5, 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE 2014. **Acidente Vascular Cerebral (AVC)**. Disponível em < <http://www.brasil.gov.br/saude/2012/04/acidente-vascular-cerebral-avc>>. Acesso em: 15 de dezembro de 2017.

MURRAY, C.J.L.; LOPES, A.D. Mortality by cause for eight regions of the world: global burden of disease. **Lancet**, v.349, p.1269-76, 1997.

NATUVA, S. S.h; Independent predictors of severity and functional outcome of acute ischemic stroke in patients with diabetes. **Journal of Neurology and Experimental Neuroscience**, Nellore, v. 2, 2016.

OH, M. S. et al. Long-term prognosis of symptomatic isolated middle cerebral artery disease in Korean stroke patients. **BMC neurology**, v. 11, p. 138, Jan. 2011.

PANDEY, A.; SHRIVASTAVA, A.; SOLANKI, A. Study of atherogenic lipid profile, high sensitive C-reactive protein, neurological deficit and short-term outcome in stroke subtypes. **Iranian Journal of Neurology**, Teerã, v. 15 (3), p. 146-152, 2016.

PARMAR, K.N. **A Imunidade pós-AVC: da Inflamação à Infecção**. 2016. 17F. Dissertação de Mestrado (Mestrado Integrado em Medicina). Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa, Lisboa, 2016.

PEAKMAN, M.; VERGANI, D. **Imunologia básica e clínica**. Rio de Janeiro. GUANABARA-KOOGAN, 1999. 327 p.

PEREIRA, A. B. C. N. G. et al. Prevalência de acidente vascular cerebral em idosos no Município de Vassouras, Rio de Janeiro, Brasil, através do rastreamento de dados do Programa Saúde da Família. **Revista Caderno Saúde Pública**, Rio de Janeiro, 25(9):1929-1936, setembro, 2009.

RALLIDIS, L.S. et al. Inflammatory markers and in-hospital mortality in acute ischemic stroke. **Atherosclerosis**, 189: 193-197, 2006.

RAYASAM, A. et al. Immune responses in stroke: how the immune system contributes to damage and healing after stroke and how this knowledge could be translated to better cures? **Immunology**. doi: 10.1111/imm.12918, 2018.

RODRIGUES, M.S.; SANTANA, L. F.; GALVAO, I. M. Fatores de risco modificáveis e não modificáveis do AVC isquêmico: uma abordagem descritiva. **Rev Med**, São Paulo, 96(3): 187-192, jul/set, 2017.

ROSAMOND, W. 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**, v. 340, p. 115-126, 1999.

SMOLDERS, J.; DAMOISEAUX, J.; MENHEERE, P. Vitamin D as an immune modulator in multiple sclerosis, a review. **J. Neuroimmunol**, v. 194, p. 7-17, 2008.

SOUSA, S. M. **A vitamina D e seu papel na prevenção de doenças**. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2016.

STRANDBERG, E. T.; TILVIS, S. C-reactive Protein, cardiovascular risk factors, and mortality in a prospective study in the elderly. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 20, p. 1057-1060, 2000.

SWAROSKA, et al. The sustained increase of plasma fibrinogen during ischemic stroke predicts worse outcome independently of baseline fibrinogen level. **Inflammation**, Bethesda, v. 37, n.4: 1142- 1147, 2014.

STRANDBERG, T. E.; TILVIS, R.S. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. **Journal of the American Heart Association**, Dallas, n. 20: 1057-1060, 2000.

TAVARES, V. E. L. **Biomarcadores úteis para informar doente e médico na escolha da opção mais adequada para tratamento do cancro da próstata.** 2016. 33 f. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina). Universidade do Porto, Porto, 2016.

TUN, N. N. et al. Diabetes mellitus and stroke: a clinical update. **World Journal of Diabetes**, Bethesda, v. 8(6), 2017.

URRUTIA-PEREIRA, M.; SOLÉ, D. Deficiência de vitamina D na gravidez e o seu impacto sobre o feto, o recém-nascido e na infância. **Revista Paulista de Pediatria**, São Paulo, v.33, n.1, 2015.

VANGILDER, R. L. et al. C-reactive protein and long-term ischemic stroke prognosis. **Journal of Clinical Neuroscience**, Rio de Janeiro, v. 21, p. 547-553, 2014.

VILA, N. et al. Proinflammatory cytokines and early neurological worsening in ischemic stroke. **Stroke**, 31:2325-2329, 2000.

WALD, N.J.; LAW, M.R. A strategy to reduce cardiovascular disease by more than 80%. **BMJ**, v. 326, p. 1419, 2003.

WANG, Q; TANG, XN; YENARI, MA.; The inflammatory response in stroke. **J Neuroimmunol**, 184:53-68, 2007.

WHITELEY, W. et al. Inflammatory markers and poor outcome after stroke: a prospective cohort study and systematic review of interleukin-6. **PLoS Medicine**, v.6, n. 9, setembro 2009.

WHO. Instrumento STEPS de Acidente Vascular Cerebral. **Enfoque passo a passo da OMS para a vigilância de acidentes vascular cerebrais.** Genebra, 2009.

YU, H. et al. High-sensitivity C-reactive protein in stroke patients- The importance in consideration of influence of multiple factor in the predictability for disease severity and death. **Journal of Clinical Neuroscience**, Rio de Janeiro, 2016.

ANEXO 1 – APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS DA UEL



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

Prezado(a) Senhor(a):

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:

"BIOMARCADORES GENÉTICOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO NO ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO: estudo da relevância clínica e da influência no prognóstico dos pacientes"

Situação do Projeto: **APROVADO**

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.

Londrina, 20 de dezembro de 2011.

Prof. Dra. Alexandrina Aparecida Maciel Cardelli
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos
Universidade Estadual de Londrina

ANEXO 2A - 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: _____

ANEXO 2B - 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: _____

ANEXO 3 - 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/UUEL,
CAE 0250.0.268.000-11

Data de internação ____/____/____ Horário da coleta ____:____

IDENTIFICAÇÃO

Nome: _____ ID _____

Idade: _____ anos Sexo: () M () F

Etnia _____

Antecedentes Mórbidos Pessoais: () HAS () DM

() Dislipidemia () Sedentarismo

() Dça Autoimune () Dça Hematológica

() Dça Infecciosa () AVC () IAM

Outros:

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 Clinica 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 apresentam 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 o cuidado consigo próprio

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

6- Morte

TOTAL (0–6): _____

ANEXO 4 – E-MAIL DE SUBMISSÃO DO ARTIGO À REVISTA

Molecular Neurobiology - Submission Notification to co-author



Molecular Neurobiology <em@editorialmanager.com>

qua 28/02, 14:22

Você

Responder | v

Mestrado AC 2016

Re: "Immune-inflammatory, oxidative stress and metabolic biomarkers predicting death after acute ischemic stroke"

Full author list: Edna Maria Vissoci Reiche, Doctor of Science; Jair Roberto Gelinski, Master in Clinical Analysis; Daniela Frizon Alfieri, Master in Health Sciences; Tamires Flauzino, Master in Health Sciences; Marcio Francisco Lehmann, Doctor in Health Sciences; Maria Caroline Martins Araújo, Specialist in Clinical Neurology; Marcell Alysson Batisti Lozovoy, Doctor in Experimental Pathology; Andrea Name Colado Simão, Doctor in Experimental Pathology; Elaine Regina Delicato de Almeida, Doctor in Experimental Pathology; Michael Maes, MD, PhD

Dear Dr Elaine Regina de Almeida,

We have received the submission entitled: "Immune-inflammatory, oxidative stress and metabolic biomarkers predicting death after acute ischemic stroke" for possible publication in Molecular Neurobiology, and you are listed as one of the co-authors.

The manuscript has been submitted to the journal by Dr. Dr Edna Maria Vissoci Reiche who will be able to track the status of the paper through his/her login.

If you have any objections, please contact the editorial office as soon as possible. If we do not hear back from you, we will assume you agree with your co-authorship.

Thank you very much.

With kind regards,

Springer Journals Editorial Office
Molecular Neurobiology