

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**BIOMARCADORES SÉRICOS E PROGNÓSTICO  
NO ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL ISQUÊMICO**

Fabiane Neiva Backes

Porto Alegre  
2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**BIOMARCADORES SÉRICOS E PROGNÓSTICO  
NO ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL ISQUÊMICO**

Fabiane Neiva Backes

Orientador: Prof. Dr. Marino Muxfeldt Bianchin

Tese apresentada como requisito parcial para  
obtenção de título de Doutor em Medicina:  
Ciência Médicas, da Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em  
Medicina: Ciências Médicas.

Porto Alegre  
2019

### CIP - Catalogação na Publicação

Backes, Fabiane Neiva  
Biomarcadores Séricos e Prognóstico no Acidente  
Vascular Cerebral Isquêmico / Fabiane Neiva Backes. --  
2019.  
133 f.  
Orientador: Marino Muxfeldt Bianchin.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de  
Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto  
Alegre, BR-RS, 2019.

1. Acidente Vascular Cerebral Isquêmico. 2. Escalas  
Neurológicas. 3. Biomarcadores Séricos. I. Bianchin,  
Marino Muxfeldt, orient. II. Título.

## **BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. Carlos Roberto de Mello Rieder

Prof. Dr. Cassiano Teixeira

Prof. Dr. Jorge Amilton Hoher

Profa. Dra. Silvia Regina Rios Vieira

Profa. Dra. Vanessa Martins de Oliveira

À minha família e amigos,  
esteio da minha existência.  
À minha mãe, Marlice,  
exemplo de honestidade e perseverança.  
Às minhas irmãs, Ariane e Simone,  
por tudo que representam na minha vida.  
Ao meu pai, Bertilo (*in memoriam*),  
por todos os ensinamentos deixados.

## **Agradecimentos**

Agradeço ao Professor Marino Muxfeldt Bianchin pela orientação, paciência, atenção, dedicação e participação em minha busca pelo aperfeiçoamento profissional e pessoal.

Agradeço à Professora Andressa de Souza pela prestatividade, viabilizando a execução deste estudo.

Agradeço às minhas irmãs, Ariane e Simone, torcedoras constantes dos meus objetivos e sonhos.

Agradeço aos meus pais, Marlice e Bertilo, pelo exemplo de amor, dignidade e trabalho.

Agradeço à Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e ao Programa de Pós-Graduação em Medicina - Ciências Médicas (PPGCM) pela oportunidade de aperfeiçoamento científico e profissional.

Agradeço ao FIPE-HCPA pelo apoio recebido.

Enfim, agradeço a Deus por tudo.

## RESUMO

**Fundamentação:** O acidente vascular cerebral (AVC) isquêmico apresenta alta morbidade, sendo responsável por sequelas motoras, sensoriais e cognitivas. A predição de desfechos após o evento isquêmico agudo é de interesse de médicos, pacientes e seus familiares para definições de tratamentos e de medidas de reabilitação, bem como para determinação de cuidados paliativos. Na prática clínica, a avaliação prognóstica está baseada em escalas neurológicas validadas, no entanto, as escalas apresentam limitações, não sendo capazes de avaliar todas as dimensões da doença. Dessa forma, a dosagem de biomarcadores sanguíneos associada à utilização de escores já amplamente usados pode melhorar a predição das sequelas. A isquemia cerebral causa a liberação de componentes altamente imunogênicos ou padrões moleculares associados a danos (DAMPs) do cérebro para a circulação sistêmica. Esses DAMPs ativam e recrutam células imunes periféricas para regiões cerebrais lesionadas. Como consequência, processos tóxicos ou pró-inflamatórios e protetores ou anti-inflamatórios são ativados após o acidente vascular cerebral isquêmico. O presente estudo objetiva investigar a associação de alguns biomarcadores sanguíneos com as escalas de AVC, bem como avaliar a capacidade dos biomarcadores selecionados na predição de desfechos neurológicos durante o tempo de acompanhamento hospitalar e após quatro anos. Para este estudo, selecionamos quatro importantes biomarcadores envolvidos no processo inflamatório pós-isquêmico: receptor desencadeador expresso nas células mielóides tipo 1 (TREM-1), receptor desencadeador expresso nas células mielóides tipo 2 (TREM-2), interleucina 23 (IL-23) e interleucina 17 (IL-17).

**Material e Métodos:** Incluímos cinquenta pacientes consecutivos com AVC isquêmico agudo admitidos na unidade neurovascular da emergência ou na unidade de medicina intensiva do Hospital de Clínicas de Porto Alegre dentro de 24 horas após o início dos sintomas. Foram coletadas amostras sanguíneas nas primeiras 24 horas, no terceiro e no quinto dias após o AVC para dosagem de TREM-1, TREM-2, IL-23 e IL-17. A gravidade do AVC e o grau de dependência funcional dos pacientes foram mensurados através da escala do *National Institutes of Health Stroke Scale* (NIHSS) nas primeiras 24 horas do evento agudo, no terceiro e quinto dias após o AVC e no momento da alta hospitalar. Também foi aplicada a escala de Rankin modificada (mRS) nos três momentos das coletas sanguíneas, na alta hospitalar e após quatro anos. Para análise dos desfechos neurológicos de curto e longo prazos, os pacientes foram subdivididos em dois grupos, considerando desfecho favorável (NIHSS  $\leq$  6 e mRS  $\leq$  2) e desfecho desfavorável (NIHSS  $>$  6 e mRS  $>$  2).

**Resultados:** A taxa de mortalidade atingiu 28% após quatro anos. Analisando as correlações entre os biomarcadores e as escalas de AVC, o TREM-1 exibiu correlações com as escalas de NIHSS e mRS dentro de 24 horas (NIHSS e TREM-1:  $p=0,029$ ; mRS e TREM-1:  $p=0,023$ ) e a IL-23 exibiu correlação apenas com a mRS em 24 horas ( $p=0,017$ ). Os níveis séricos de TREM-1 e IL-23 em 24 horas também apresentaram a melhor correlação com os resultados neurológicos na alta hospitalar (NIHSS e TREM-1:  $p=0,021$ ; mRS e TREM-1:  $p=0,049$ ; mRS e IL-23:  $p=0,033$ ). Ambos os escores neurológicos para desfecho favorável (NIHSS  $\leq$  6 e mRS  $\leq$  2) na alta hospitalar correlacionaram-se com as concentrações de TREM-1 nas primeiras 24 horas e com os níveis de IL-23 nas primeiras 24 horas e no quinto dia, com baixo valor preditivo. As demais medidas não mostraram capacidade preditiva durante o tempo de observação hospitalar ou após quatro anos. As concentrações séricas de TREM-1 nas primeiras 24 horas após o AVC foram significativamente maiores em pacientes

com desfecho desfavorável (mRS > 2) na alta hospitalar ( $p=0,021$ ). Todavia, não houve associação entre os níveis de TREM-2, IL-23 e IL-17 e a dicotomização dos resultados neurológicos na alta hospitalar e após quatro anos.

**Conclusão:** Os biomarcadores séricos podem ser úteis na avaliação da severidade do AVC, correlacionando-se com achados clínicos e apresentando valor prognóstico. Neste estudo, TREM-1 e IL-23 foram os melhores biomarcadores prognósticos.

**Palavras-chave:** *cerebral ischemic stroke, blood biomarkers, outcome, triggering receptor expressed on myeloid cells type 1 (TREM-1), triggering receptor expressed on myeloid cells type 2 (TREM-2), interleukin 23 (IL-23), interleukin 17 (IL-17).*



## ABSTRACT

**Background and Purpose:** Ischemic stroke causes a broad spectrum of motor, sensory and cognitive impairments. There is an urgent need for accurate outcome prediction after acute ischemic stroke for physicians, patients, and their families to aid in early and informed decision-making about therapies, palliative care, or rehabilitation. In clinical practice, the prognosis is based on well-validated stroke scales, but they have limitations, and blood biomarkers measurements may improve the predictive capability. Cerebral ischemia causes the release of highly immunogenic components or damage-associated molecular patterns (DAMPs) from the brain into the systemic circulation. These DAMPs activate and recruit peripheral immune cells to injured brain regions. As a consequence, toxic or proinflammatory and protective or anti-inflammatory processes are activated after stroke. This study aimed to investigate the association of blood biomarkers with stroke scales and their predictive value after acute stroke at the time of admission until hospital discharge and after four years. For this study, we selected four important biomarkers involved in the post-ischemic inflammatory process: triggering receptor expressed on myeloid cells type 1 (TREM-1), triggering receptor expressed on myeloid cells type 2 (TREM-2), interleukin 23 (IL-23) and interleukin 17 (IL-17).

**Material and Methods:** Fifty consecutive patients with acute ischemic stroke admitted to the neurovascular emergency unit or intensive care unit at Hospital de Clínicas de Porto Alegre within 24 hours of stroke onset were enrolled. All patients provided venous blood samples for TREM-1, TREM-2, IL-23 and IL-17 measurements within 24 hours of the acute event and on the third and fifth day after the stroke. Neurological stroke severity and global disability were determined with the National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS) within 24 hours of the acute event, on the third and fifth day after the stroke, and at the time of hospital discharge. The modified Rankin Scale (mRS) was applied at the same times and after four years. For short-term and long-term neurological outcome analysis, the patients were subdivided into two groups: favorable (NIHSS  $\leq 6$  and mRS  $\leq 2$ ) and poor outcome (NIHSS  $> 6$  and mRS  $> 2$ ).

**Results:** The mortality rate reached 28% after four years. Analyzing the correlations between these biomarkers and stroke scales, TREM-1 exhibited correlations with NIHSS and mRS within 24 hours (NIHSS and TREM-1:  $p=0.029$ ; mRS and TREM-1:  $p=0.023$ ) and IL-23 exhibited correlation only with mRS within 24 hours ( $p=0.017$ ). The serum levels of TREM-1 and IL-23 within 24 hours also presented the best correlation with the neurological outcomes at hospital discharge (NIHSS and TREM-1:  $p=0.021$ ; mRS and TREM-1:  $p=0.049$ ; mRS and IL-23:  $p=0.033$ ). Both neurologic scores showing favorable outcome (NIHSS  $\leq 6$  and mRS  $\leq 2$ ) at hospital discharge were correlated with the TREM-1 protein concentration within 24 hours and to IL-23 protein also within 24 hours and on the fifth day, with low predictive value. The other measurements did not show predictive capacity during the hospital observation time or after four years. The serum concentrations of TREM-1 protein within 24 hours after stroke was significantly higher in patients with poor outcome (mRS  $> 2$ ) at hospital discharge ( $p=0.021$ ). However, there was no correlation between TREM-2, IL-23 and IL-17 levels with the dichotomization of neurological outcomes at hospital discharge and after four years.

**Conclusion:** Blood biomarkers may be useful in acute stroke by suggesting stroke severity, correlating with clinical findings, or providing prognostic value. In this study, TREM-1 and IL-23 were found to be the best prognostic biomarkers.

**Keywords:** cerebral ischemic stroke, blood biomarkers, outcome, triggering receptor expressed on myeloid cells type 1 (TREM-1), triggering receptor expressed on myeloid cells type 2 (TREM-2), interleukin 23 (IL-23), interleukin 17 (IL-17).

## LISTA DE TABELAS E FIGURAS DA DISSERTAÇÃO

### Tabelas

Tabela 1:	Características da população estudada	.....	105.
Tabela 2:	Comparação dos valores dos biomarcadores entre os momentos de mensuração	.....	106.
Tabela 3:	Comparação dos valores dos biomarcadores entre pacientes com AVC isquêmico (casos) e controles	.....	107.
Tabela 4:	Correlações entre os biomarcadores e as escalas de AVC NIHSS e mRS	.....	108.
Tabela 5:	Matriz de correlação entre os biomarcadores e as escalas de AVC NIHSS e mRS na alta hospitalar e após 4 anos	.....	109.
Tabela 6:	Valores para área da curva ROC dos biomarcadores na predição de desfecho neurológico favorável pelas escalas de AVC NIHSS e mRS	.....	110.
Tabela 7:	Comparação dos valores dos biomarcadores entre pacientes com mRS $\leq 2$ e mRS $> 2$ na alta hospitalar	.....	111.
Tabela 8:	Comparação dos valores dos biomarcadores entre pacientes com NIHSS $\leq 6$ e NIHSS $> 6$ na alta hospitalar	.....	112.
Tabela 9:	Comparação dos valores dos biomarcadores entre pacientes com mRS $\leq 2$ e mRS $> 2$ após 4 anos	.....	113.
Tabela 10:	Correlações entre os biomarcadores e o tempo de internação hospitalar	.....	114.
Tabela 11:	Comparação dos valores dos biomarcadores entre os tamanhos de AVC (lacunar e segmentar)	.....	115.

## **Figuras**

Figura 1:	Estratégia de busca de referências bibliográficas .....	21.
Figura 2:	Marco conceitual .....	42.

## LISTA DE TABELAS E FIGURAS DO ARTIGO 1

### Tabelas

Table 1:	Baseline characteristics of the study population	.....	70.
Table 2:	Blood biomarkers according to time points of observation	.....	71.
Table 3:	Comparison of serum biomarker values between patients with ischemic stroke (cases) and controls	.....	71.
Table 4:	Correlations between biomarkers and stroke scales NIHSS and mRS	.....	72.
Table 5:	Correlation matrix between biomarkers and stroke scales NIHSS and mRS at discharge and after four years	.....	72.
Table 6:	Values for area under the ROC curve of serum biomarkers for predicting good outcome of stroke scales NIHSS and mRS at discharge and after four years	.....	73.
Table 7:	Comparison of serum biomarkers values between patients with mRS $\leq 2$ vs mRS $> 2$ at discharge	.....	73.
Table 8:	Comparison of serum biomarkers values between patients with NIHSS $\leq 6$ vs NIHSS $> 6$ at discharge	.....	74.
Table 9:	Comparison of serum biomarkers values between patients with mRS $\leq 2$ vs mRS $> 2$ after four years	.....	74.
Table 10:	Correlations between biomarkers and the length of the hospital stay	.....	75.
Table 11:	Comparison of serum biomarker values between stroke size (lacunar vs segmental)	.....	75.

## Figuras

Figure 1:	Comparison of serum biomarker values between patients with ischemic stroke (cases) and controls	.....	76.
Figure 2:	Comparison of serum biomarkers values between patients with mRS $\leq 2$ vs mRS $> 2$ at discharge	.....	76.
Figure 3:	Comparison of serum biomarkers values between patients with NIHSS $\leq 6$ vs NIHSS $> 6$ at discharge	.....	76.
Figure 4:	Comparison of serum biomarkers values between patients with mRS $\leq 2$ vs mRS $> 2$ in 4 years	.....	77.

## LISTA DE TABELAS E FIGURAS DO ARTIGO 2

### Tabelas

Table 1:	Baseline characteristics of the study population	.....	94.
Table 2:	Blood biomarkers according to time points of observation	.....	95.
Table 3:	Comparison of serum biomarker values between patients with ischemic stroke (cases) and controls	.....	95.
Table 4:	Correlations between biomarkers and stroke scales NIHSS and mRS	.....	96.
Table 5:	Correlation matrix between biomarkers and stroke scales NIHSS and mRS at discharge and after four years	.....	96.
Table 6:	Values for area under the ROC curve of serum biomarkers for predicting good outcome of stroke scales NIHSS and mRS at discharge and after four years	.....	97.
Table 7:	Comparison of serum biomarkers values between patients with mRS $\leq 2$ vs mRS $> 2$ at discharge	.....	97.
Table 8:	Comparison of serum biomarkers values between patients with NIHSS $\leq 6$ vs NIHSS $> 6$ at discharge	.....	98.
Table 9:	Comparison of serum biomarkers values between patients with mRS $\leq 2$ vs mRS $> 2$ after four years	.....	98.
Table 10:	Correlations between biomarkers and the length of the hospital stay	.....	99.
Table 11:	Comparison of serum biomarker values between stroke size (lacunar vs segmental)	.....	99.

## Figuras

Figure 1:	Comparison of serum biomarker values between patients with ischemic stroke (cases) and controls	.....	100.
Figure 2:	Comparison of serum biomarkers values between patients with mRS $\leq 2$ vs mRS $> 2$ at discharge	.....	100.
Figure 3:	Comparison of serum biomarkers values between patients with NIHSS $\leq 6$ vs NIHSS $> 6$ at discharge	.....	100.
Figure 4:	Comparison of serum biomarkers values between patients with mRS $\leq 2$ vs mRS $> 2$ in 4 years	.....	101.



## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AHA: *American Heart Association*

AIT: isquemia cerebral transitória

AngioTC: angiotomografia

APACHE II: *Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II*

ASPECTS: *Alberta Stroke Program Early TC Score*

AVC: acidente vascular cerebral

AUC: *area under the curve*

BBB: *blood-brain barrier*

BHE: barreira hematoencefálica

BI: *Barthel Index*

CAAE: Certificado de Apresentação para Apreciação Ética

CEP: *Institutional Committee of Ethics*; Comitê de Ética em Pesquisa

CNS: *central nervous system*

CT: *computed tomography*

CXCL2: proteína inflamatória de macrófagos 2

DAMPs: padrões moleculares associados a danos; *Damage-Associated Molecular Patterns*

EDTA: *ethylenediamine tetraacetic acid*

FN $\kappa$ B: fator nuclear  $\kappa$ B

GEE: *generalized estimating equations*

GOS: *Glasgow Outcome Scale*

HAMPs: *Homeostasis-Altering Molecular Processes*

HMGB1: *high mobility group box 1 protein*

ICAM-1: moléculas de adesão intercelular tipo 1; *intercellular adhesion molecules 1*

ICIDH: *International Classification of impairments, disabilities and handicaps*

IFN $\gamma$ : interferon  $\gamma$

IL-17: interleucina 17; *interleukin 17*

IL-23: interleucina 23; *interleukin 23*

iNOS: óxido nítrico sintase induzível

IRF3: fator regulador do interferon 3

IRF4: fator regulador do interferon 4

LDL-ox: lipoproteína de baixa densidade oxidada

LOX-1: receptor de LDL oxidado semelhante à lectina

LPS: lipopolissacarídeos

MMPs: matriz de metaloproteinases; *metalloproteinases matrix*

MR: *magnetic resonance*

mRS: *modified Rankin Scale*

My88: fator de diferenciação mielóide 88

NIHSS: *National Institutes of Health Stroke Scale*

NLRs: *Nod-like receptors*

NNT: número necessário para tratar

NO: óxido nítrico

PAMPs: *Pathogen-Associated Molecular Patterns*

PDGF: fator de crescimento derivado das plaquetas

PET: tomografia com emissão de pósitrons

RNM: ressonância nuclear magnética

rt-PA: alteplase

SAPS II: *Simplified Acute Physiology Score II*

SD: *standard deviation*

SIDS: Síndrome de Imunodepressão Associada ao AVC

SOFA: *Sequential Organ Failure Assessment*

STAT1: ativador do fator transcriptor 1

STAT6: ativador do fator transcriptor 6

TC: tomografia computadorizada

TGF $\beta$ : fator transformador de crescimento  $\beta$

Th: linfócitos T *helper*

TLRs: receptores tipo Toll; *Toll-like receptors*

TNF $\alpha$ : fator de necrose tumoral  $\alpha$

TOAST: *Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment*

Treg: células T reguladoras; *T regulatory cells*

TREM-1: receptor desencadeador expresso nas células mielóides tipo 1; *triggering receptor expressed on myeloid cells type 1*

TREM-2: receptor desencadeador expresso nas células mielóides tipo 2; *triggering receptor expressed on myeloid cells type 2*

T  $\gamma\delta$ : *gamma-delta T cells*

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	18
2. REVISÃO DA LITERATURA .....	20
2.1 ESTRATÉGIAS PARA LOCALIZAR E SELECIONAR AS INFORMAÇÕES .....	20
2.2 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	23
2.3 ESCALAS DE AVC .....	28
2.4 BIOMARCADORES.....	30
2.4.1 <i>Proteínas TREM</i> .....	35
2.4.2 <i>Interleucinas</i> .....	38
3. MARCO CONCEITUAL .....	41
4. JUSTIFICATIVA.....	43
5. OBJETIVOS .....	44
5.1 OBJETIVO PRIMÁRIO .....	44
5.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS .....	44
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45
7. ARTIGO 1 .....	54
8. ARTIGO 2 .....	78
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	102
10. PERSPECTIVAS FUTURAS .....	116
11. ANEXOS .....	117
11.1 NIHSS - NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH STROKE SCALE.....	117
11.2 MRS - MODIFIED RANKIN SCALE.....	125
11.3 TERMO DE CONSENTIMENTO .....	126
11.4 FICHA DE AVALIAÇÃO .....	128
11.5 FICHA DE REAVALIAÇÃO .....	131

## 1. INTRODUÇÃO

O acidente vascular cerebral (AVC) é a emergência neurológica prevalente na maioria dos países, a segunda maior causa de morte e a maior causa de morbidade no mundo<sup>1, 2, 3</sup>. A maioria dos sobreviventes permanece com alguma forma residual de incapacidade e em torno de 50% não retoma sua independência funcional, o que resulta no aumento significativo de hospitalizações e de gastos públicos com o tratamento das sequelas e complicações decorrentes do AVC<sup>1, 3</sup>.

O AVC é definido como um déficit neurológico de início abrupto causado por uma redução do fluxo sanguíneo cerebral, e as manifestações clínicas variam de acordo com o território vascular envolvido<sup>4, 5</sup>. O diagnóstico do AVC é clínico, baseado na história e no exame físico. No entanto, exames complementares, incluindo exames laboratoriais e de neuroimagem, corroboram o diagnóstico e a tomografia computadorizada (TC) sem contraste inicial é essencial para diferenciar o AVC isquêmico do AVC hemorrágico<sup>4, 5, 6, 7, 8</sup>.

O uso de escalas de AVC para avaliação clínica dos pacientes é importante na rotina clínica e em pesquisas, pois sistematiza e homogeneiza as análises clínicas, aumenta a acurácia diagnóstica, auxilia na escolha de tratamentos específicos, permite a monitorização dos déficits neurológicos ao longo do tempo de acompanhamento, contribui para predição dos desfechos e para avaliação da resposta aos tratamentos, além de facilitar a comunicação entre os profissionais envolvidos. Portanto, apesar de uma única escala não abordar todos esses diferentes propósitos, sendo necessário o uso de escalas específicas para os diferentes aspectos relativos ao efeito da doença, a aplicação de escalas validadas é essencial<sup>9, 10, 11</sup>.

O AVC, mesmo considerando apenas o AVC isquêmico, é uma doença heterogênea com diferentes tamanhos, localizações e mecanismos fisiopatológicos<sup>7, 8</sup>. O uso de biomarcadores pode auxiliar no diagnóstico, na diferenciação da causa e na predição prognóstica do AVC, sendo a identificação de biomarcadores clínicos para o AVC objeto de intensa pesquisa<sup>12, 13</sup>. Os biomarcadores devem preencher uma série de pré-requisitos para seu uso clínico, como: mensuração acurada, precisa e reprodutível, altas sensibilidade e especificidade, interpretação fácil por clínicos e acréscimo de informações a variáveis já validadas (ex.: escalas de AVC). Além disso, devem ser detectados em fluidos ou tecidos biológicos e representar diferentes

processos fisiopatológicos da doença<sup>12, 14, 15</sup>. Há um interesse crescente no uso de dosagens sanguíneas de biomarcadores que atravessam a barreira hematoencefálica, pois as coletas de amostras de sangue seriadas apresentam menos riscos, contraindicações, dificuldades e desconforto ao paciente comparadas às dosagens líquóricas, permitindo a correlação desses marcadores com a evolução do processo neurológico<sup>16</sup>. No entanto, até o momento, não foi identificado o biomarcador ou um painel de biomarcadores ideal para o AVC<sup>12, 13, 14, 15, 17</sup>.

Apesar do AVC isquêmico ser uma doença complexa, sabe-se que a inflamação está fortemente envolvida na sua fisiopatologia<sup>15, 18</sup>. Nesse estudo procuramos correlacionar alguns biomarcadores séricos envolvidos na resposta inflamatória após o AVC com a severidade e o prognóstico dos pacientes durante a internação hospitalar e após 4 anos do evento isquêmico. Foram escolhidos os seguintes biomarcadores: receptor desencadeador expresso nas células mielóides tipo 1 (TREM-1), receptor desencadeador expresso nas células mielóides tipo 2 (TREM-2), interleucina-23 (IL-23) e interleucina 17 (IL-17). Dentre as escalas neurológicas usadas para avaliação dos déficits e limitações em pacientes com AVC escolhemos, baseados em estudos anteriores e na ampla utilização clínica e científica, as escalas: NIHSS (*National Institutes of Health Stroke Scale*) e mRS (*modified Rankin Scale*).

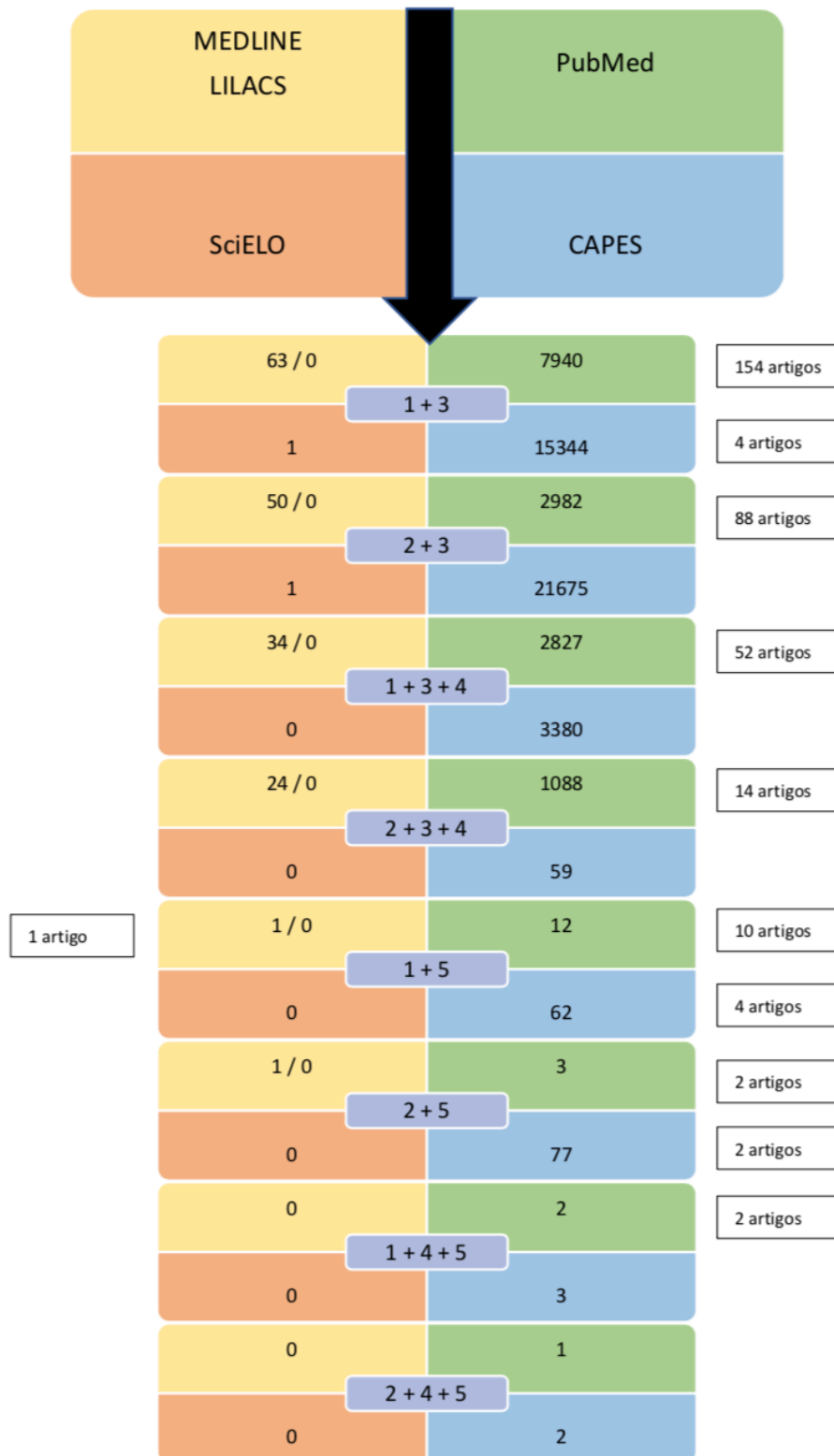
## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Estratégias para localizar e selecionar as informações

A predição de desfechos após o AVC isquêmico é importante para médicos, pacientes e pesquisadores. Os melhores modelos clínicos prognósticos validados não são suficientemente acurados para prever a evolução individual dos pacientes após o AVC. A performance dos modelos clínicos, como as escalas ou os escores, provavelmente pode ser aprimorada pelo uso de biomarcadores séricos envolvidos nos diversos processos fisiopatológicos do AVC.

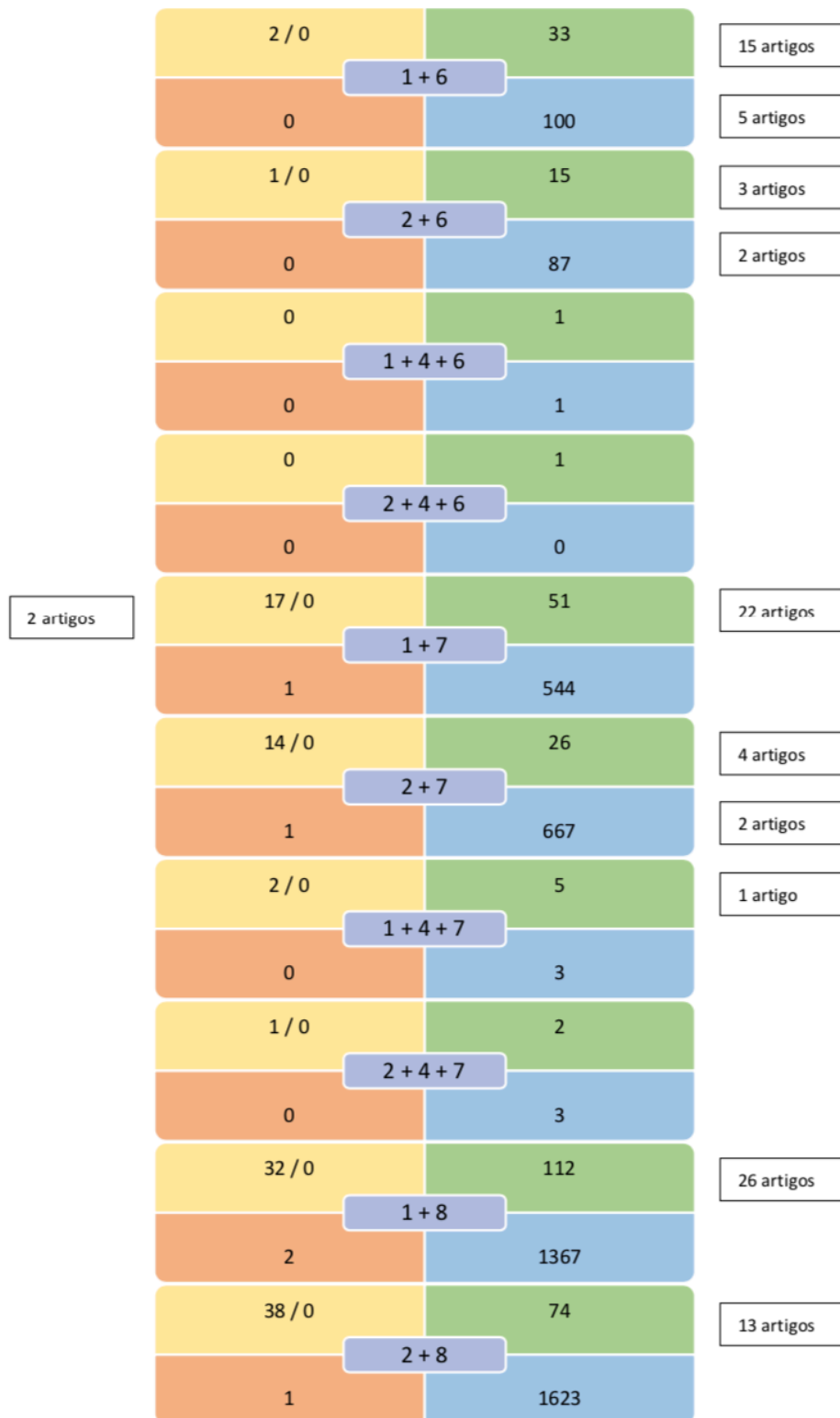
A revisão da literatura para esse trabalho foi focada no uso e na importância de biomarcadores séricos como preditores de prognóstico em pacientes neurológicos após AVC isquêmico. A estratégia de busca envolveu cinco bases de dados: *PubMed*, *MEDLINE*, *LILACS*, *CAPES* e *SciELO*, no período de 1987 a 2019. Os descritores usados foram: (1) *cerebral stroke*, (2) *ischemic stroke*, (3) *blood biomarkers*, (4) *outcome or prognostic*, (5) *triggering receptor expressed on myeloid cells-1*, (6) *triggering receptor expressed on myeloid cells-2*, (7) *interleukin-23*, (8) *interleukin-17*, (9) *stroke scales*.

Figura 1: Estratégia de Busca de Referências Bibliográficas



Em cada box central os números indicados correspondem aos descritores do fator de estudo: (1) cerebral stroke, (2) ischemic stroke, (3) blood biomarkers, (4) outcome or prognostic, (5) triggering receptor expressed on myeloid cells-1, (6) triggering receptor expressed on myeloid cells-2, (7) interleukin-23, (8) interleukin-17, (9) stroke scales.

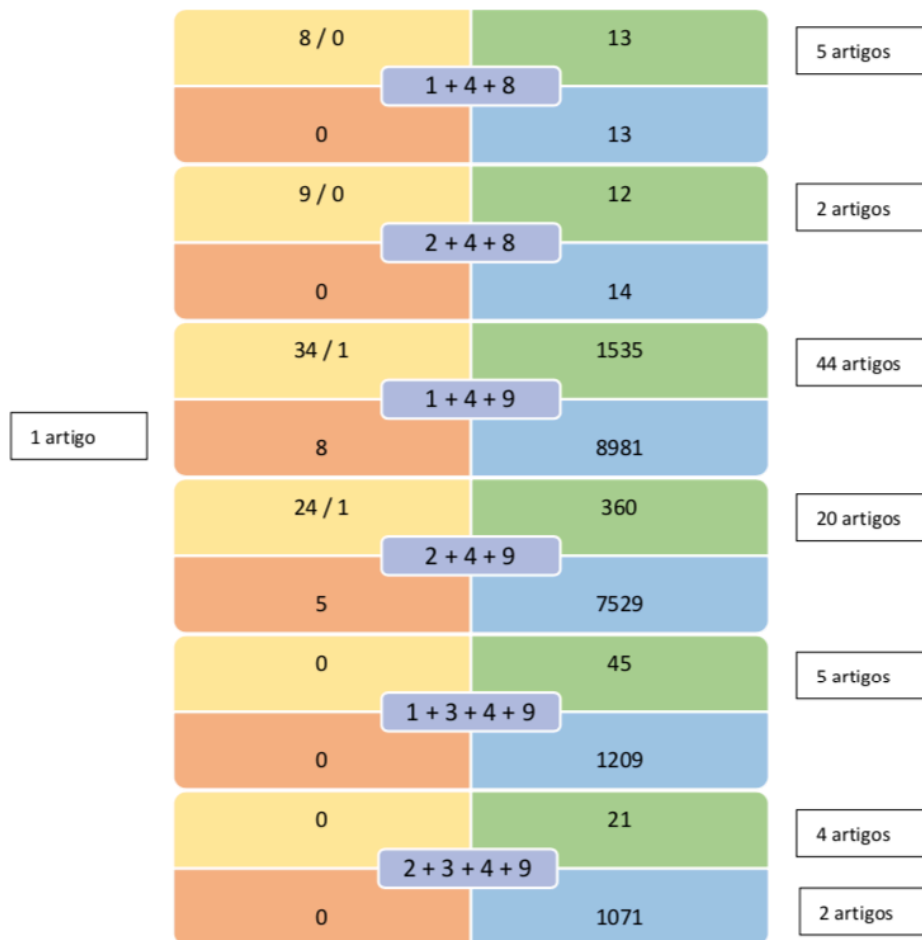
Figura 1: Estratégia de Busca de Referências Bibliográficas



Em cada box central os números indicados correspondem aos descritores do fator de estudo: (1) *cerebral stroke*, (2) *ischemic stroke*, (3) *blood biomarkers*, (4) *outcome or prognostic*, (5) *triggering receptor expressed on myeloid cells-1*, (6) *triggering receptor expressed on myeloid cells-2*, (7) *interleukin-23*, (8) *interleukin-17*, (9) *stroke scales*.



Figura 1: Estratégia de Busca de Referências Bibliográficas



Em cada box central os números indicados correspondem aos descritores do fator de estudo: (1) *cerebral stroke*, (2) *ischemic stroke*, (3) *blood biomarkers*, (4) *outcome or prognostic*, (5) *triggering receptor expressed on myeloid cells-1*, (6) *triggering receptor expressed on myeloid cells-2*, (7) *interleukin-23*, (8) *interleukin-17*, (9) *stroke scales*.

## 2.2 Considerações gerais

As doenças cerebrovasculares abrangem os AVC isquêmicos e hemorrágicos e apresentam altas taxas de mortalidade e de morbidade<sup>1,2,3</sup>. As isquemias cerebrais representam aproximadamente 85% do total de acidentes vasculares cerebrais, sendo o problema neurológico responsável pela maioria das internações neurológicas agudas<sup>7</sup>. A incidência do AVC aumenta com a idade, conseqüentemente, o número de pessoas afetadas e os custos relacionados à doença tem se elevado com o envelhecimento da população<sup>4,5</sup>.

O AVC isquêmico é definido como um déficit neurológico de início abrupto atribuído a uma causa vascular focal com persistência dos sinais e dos sintomas por pelo menos 24 horas ou infarto cerebral demonstrado por exame de imagem. O diagnóstico é clínico, baseado na história e no exame físico, e a acurácia diagnóstica baseia-se em 3 pilares: a apresentação aguda, o território cerebral envolvido e o mecanismo fisiopatológico subjacente<sup>4, 5, 7, 8</sup>.

Na história clínica é importante definir o modo de apresentação, o momento exato do início dos sintomas e a presença de fatores de risco envolvidos. O exame neurológico deve ser objetivo e focado, com a aplicação simultânea de escalas validadas, sendo a mais usada na chegada do paciente ao hospital a escala do NIHSS, sugerindo o território vascular comprometido. Em seguida, o exame físico geral pode indicar a etiologia subjacente ou a presença de complicações associadas<sup>5, 7, 19</sup>.

Os exames de neuroimagem e laboratoriais corroboram o diagnóstico, sendo importantes no estabelecimento do diagnóstico diferencial. Na fase aguda a realização de um exame de imagem, em geral a TC sem contraste pelo seu tempo de realização rápido e pela maior disponibilidade, é importante para diferenciar o AVC isquêmico do AVC hemorrágico e orientar o tratamento inicial<sup>4, 5, 8, 19</sup>. A detecção da isquemia na TC depende de vários fatores, como local da oclusão vascular, território vascular, subtipo do AVC isquêmico, tempo de evolução dos sintomas, experiência do examinador e efetividade da circulação colateral<sup>20</sup>. Os sinais precoces de isquemia que podem ser vistos na TC são hipodensidade do tecido cerebral afetado secundário ao edema citotóxico, perda da densidade dos lobos anterior e posterior (*loss of insula ribbon sign* - quando a lesão acomete a ínsula), apagamento dos sulcos e perda da diferenciação entre as substância branca e cinzenta com indefinição dos núcleos da base. Outro sinal importante na TC é a presença do trombo no vaso afetado (vaso denso)<sup>20, 21, 22</sup>. O apagamento dos sulcos corticais sem hipodensidade associada indica, presumivelmente, aumento do volume cerebral regional e moderada hipoperfusão, incluindo elementos do *core* e principalmente da penumbra isquêmica<sup>20</sup>. A detecção de hipodensidade precoce pode ser aumentada com a utilização de janelas variáveis (largura e centro), acentuando o contraste entre a área normal e a área afetada, ou com a utilização de imagens fonte de angio-TC<sup>20, 22</sup>. Importante destacar que os sinais sempre devem ser comparados com o córtex contralateral e valorizados em pacientes com suspeita clínica de AVC isquêmico. Artefatos de

movimento e posicionamento da cabeça do paciente afetam os achados de imagem, principalmente na TC<sup>20, 23</sup>.

Uma alternativa para avaliar a extensão da isquemia é o ASPECTS (*Alberta Stroke Program Early TC Score*), que gradua a extensão do AVC isquêmico de forma semiquantitativa, utilizando como base 10 regiões de interesse, avaliadas em 2 cortes axiais de TC (plano dos núcleos da base e supraventricular). Quanto maior o número de regiões afetadas, menor o escore e pior o prognóstico<sup>20, 23</sup>. A realização da angiotomografia (angioTC) pode ser útil na avaliação da circulação colateral e na definição da realização de tratamento endovascular. A tomografia de perfusão é indicada em casos selecionados para identificação da área de penumbra, principalmente nos pacientes com tempo de início dos sintomas indefinido (ex.: *wake up stroke*), havendo benefício da realização de tratamento trombolítico. A TC com contraste é recomendada para excluir neoplasia como causa dos sintomas, o que também seria uma contraindicação à trombólise endovenosa<sup>19, 20, 23, 24</sup>. Outros exames que devem ser realizados na emergência para excluir patologias que mimetizam o AVC e auxiliam na definição do tratamento incluem: glicemia, oximetria, eletrólitos, função renal, hemograma com contagem plaquetária, marcadores de isquemia cardíaca, tempo de protrombina, tempo de tromboplastina ativada e eletrocardiograma. Em casos selecionados pode ser necessário ainda a inclusão de outros exames, como: função hepática, gasometria arterial, dosagens toxicológicas, tempo de trombina e tempo de coagulação do *ecarin* (em pacientes em uso de inibidores diretos da trombina ou do fator Xa), teste gestacional, punção lombar, eletroencefalografia, RX de tórax, doppler transcraniano associado à técnica *duplex* de vasos intracranianos e ecocardiografia<sup>5, 7, 19</sup>.

A oclusão aguda de um vaso intracraniano sem suprimento colateral para a região afetada ou a redução global do fluxo sanguíneo cerebral por hipofluxo sistêmico (hipotensão/choque) leva à isquemia seguida de infarto cerebral em minutos<sup>4, 5</sup>. A restauração do fluxo sanguíneo cerebral antes que ocorra o infarto causa sintomas transitórios, caracterizando a síndrome denominada isquemia cerebral transitória (AIT). O mesmo mecanismo se aplica à área de penumbra isquêmica, região de disfunção reversível em torno da área central de infarto após o AVC, que apresenta possibilidade de reversão e de recuperação do fluxo com a aplicação das terapias de reperfusão e que pode ser identificada pelos exames de neuroimagem - TC perfusão ou ressonância nuclear magnética (RNM) perfusão-difusão<sup>4, 23, 24</sup>.

O infarto cerebral focal ocorre por duas vias: 1 - a necrótica, causada pela quebra das estruturas do citoesqueleto celular por perda do aporte energético (falta de glicose e oxigênio que levam à perda da produção mitocondrial de ATP) e 2 – apoptótica, por morte celular programada. A falta de ATP leva à despolarização celular por influxo celular de cálcio e liberação de glutamato extracelular com efeito neurotóxico. Ademais, são produzidos radicais livres pela degradação de membranas lipídicas e pela disfunção mitocondrial que aumentam o dano a outras funções vitais celulares. Nas áreas de penumbra isquêmica ocorre facilitação da morte celular apoptótica nos dias a semanas subsequentes ao evento isquêmico<sup>4, 5, 25</sup>. Quanto à etiologia o AVC isquêmico pode ser dividido em cinco grandes categorias baseado na classificação de TOAST (*Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment*): aterosclerose de grandes vasos, cardioembólico, oclusão de pequenos vasos, etiologias determinadas menos comuns e causas indeterminadas. Apesar do tratamento agudo do AVC geralmente não depender da etiologia, definir a causa é importante para evitar a recorrência<sup>4, 6, 26</sup>.

O tratamento do AVC pode ser dividido em: intervenções agudas, prevenção e suporte. Nas últimas décadas houve um avanço importante da terapêutica aguda do AVC direcionada à reversão do déficit agudo e de sua progressão. O estudo NINDS (*Institute of Neurological Disorders and Stroke*) demonstrou que os pacientes tratados com alteplase (rt-PA) até 3 horas do início dos sintomas tinham uma chance maior de recuperar totalmente o déficit (13%) ou apresentar apenas uma sequela menor em 3 meses após o evento. Apesar do maior risco de transformação hemorrágica nos pacientes que receberam rt-PA comparado ao placebo, a mortalidade foi comparável<sup>27</sup>. Subsequentemente, o estudo ECASS III (*European Cooperative Acute Stroke Study III*) estendeu a janela terapêutica para 4,5 horas com benefícios significativos, mas menos expressivos<sup>28</sup>. Recentemente o ensaio EXTENT (*Extending the Time for Thrombolysis in Emergency Neurological Deficits*), com o uso das técnicas de perfusão por neuroimagem para demonstrar a presença de áreas cerebrais de hipoperfusão (penumbra) possibilitou ampliar o tempo de administração de rt-PA para 9 horas em pacientes com achados de neuroimagem favoráveis ou tempo de início dos sintomas indeterminado (ex.: *wake-up stroke*), observando-se uma maior porcentagem de pacientes com nenhuma ou mínima sequela (mRS 0 ou 1)<sup>29</sup>. Trabalhos realizados nos últimos anos mostraram resultados favoráveis de intervenções intra-arteriais em pacientes com oclusão proximal de grandes vasos

associadas ou não à trombólise endovenosa. Dentre esses, podemos mencionar os estudos MR-CLEAM, ESCAPE, EXTEND-IA, REVASCAT e SWIFT-PRIME que incluíram pacientes com déficits severos (NIHSS médio de aproximadamente 17), idade média em torno de 65 anos e, na maioria dos casos, tempo de início dos sintomas superior a 4,5 horas e comparam o uso endovenoso isolado de trombolítico com o tratamento intra-arterial, predominantemente trombectomia, com melhores resultados funcionais em 90 dias nos pacientes submetidos ao tratamento combinado e sem aumento significativo de transformações hemorrágicas sintomáticas<sup>30, 31, 32, 33, 34</sup>. O estudo RESILIENT, realizado em países em desenvolvimento, incluindo o Brasil, e com resultados apresentados esse ano, corroborou os resultados dos estudos prévios, demonstrando que a eficácia da trombectomia mecânica persiste quando implementada mesmo com as limitações de um sistema de saúde como o nosso, diminuindo a incapacidade com um número necessário para tratar (NNT) de apenas 6,6 e apresentando baixas taxas de complicações<sup>35</sup>.

Nos pacientes com AVC isquêmico de artéria cerebral média ou territórios cerebelares extensos que evoluem com piora neurológica secundária à hipertensão intracraniana por importante edema cerebral ou herniação, a craniectomia descompressiva com duroplastia reduziu a mortalidade e a morbidade. No entanto, a craniectomia deve ser realizada nas primeiras 48 horas, em pacientes entre 18 e 80 anos, com NIHSS > 15, com redução do nível de consciência e após novo exame de neuroimagem. Além disso, a família do paciente deve ser esclarecida quanto ao potencial risco de sequelas neurológicas severas com importante grau de dependência<sup>19, 36, 37, 38</sup>.

O manejo intensivo dos pacientes na fase aguda do AVC isquêmico inclui ainda: oxigenação e ventilação otimizadas, manejo hemodinâmico com euvolemia e uso de drogas vasoativas conforme a necessidade e repetindo os alvos pressóricos definidos para as diferentes terapias (trombólise, trombectomia ou tratamento conservador), controle glicêmico, controle de temperatura, posicionamento adequado da cabeça e da cabeceira da cama, manejo da hipertensão intracraniana quando presente e sedoanalgesia adequada<sup>5, 7, 19</sup>. A monitorização multimodal é extremamente importante nessa fase, pois permite a detecção precoce de alterações/complicações e a pronta intervenção, evitando danos secundários<sup>5, 7, 39</sup>. Nos pacientes submetidos à trombólise deve ser iniciada a antiagregação plaquetária nas primeiras 48 horas e, nos pacientes não candidatos ao tratamento trombolítico, já

nas primeiras 24 horas, preferencialmente com aspirina. Em casos selecionados a anticoagulação pode ser indicada na fase aguda, mas está contraindicada nos pacientes com áreas isquêmicas extensas pelo risco aumentado de sangramento intracerebral<sup>5, 7, 19</sup>. A prevenção baseia-se no controle dos fatores de risco, incluindo cessação do tabagismo, uso de antiagregantes plaquetários, anticoagulação quando a etiologia é cardioembólica, controle da dislipidemia com o uso de estatinas, tendo como alvo níveis de colesterol LDL menores que 70mg/dl, dentre outros<sup>7, 19</sup>.

### **2.3 Escalas de AVC**

A aplicação de escalas para avaliação de pacientes com AVC tem importância fundamental na clínica e em pesquisas. O uso de diferentes escalas, que podem ser aplicadas tanto no atendimento pré-hospitalar quanto hospitalar, homogeneiza as avaliações clínicas, aumenta a acurácia diagnóstica, permite a monitorização dos déficits neurológicos, auxilia na adequação e na escolha de tratamentos específicos, permite a mensuração de forma mais objetiva dos efeitos de um tratamento e apresenta capacidade preditiva de desfechos. Além disso, facilita a comunicação entre clínicos e pesquisadores<sup>9, 10, 11</sup>.

Em 1980 a Organização Mundial de Saúde criou uma classificação para determinar as consequências das doenças nos indivíduos, denominada "*International Classification of impairments, disabilities and handicaps (ICIDH)*", posteriormente revisada e traduzida para várias línguas, que englobava: 1- a patologia, alteração estrutural causada ao órgão ou ao sistema, 2- o déficit, perda funcional decorrente do dano estrutural, 3- a incapacidade, perda parcial ou total da capacidade de realizar uma atividade considerada normal e 4- desvantagem, efeito prejudicial da doença ao paciente na sua relação com a sociedade<sup>40, 41</sup>. Esses problemas são conceitualmente distintos, mas na prática se sobrepõe<sup>42</sup>. Deste modo, o maior desafio relacionado ao uso de escalas nas doenças cerebrovasculares diz respeito à sua capacidade de mensuração dos déficits neurológicos (ex.: hemiparesia), da perda de habilidades específicas (ex.: caminhar), da perda da habilidade de realizar atividades diárias (ex.: trabalhos e atividades de lazer) e qualidade de vida<sup>10</sup>. Há várias escalas confiáveis e validadas, mas nenhuma é capaz de avaliar todos os aspectos clínicos ou relacionados às pesquisas<sup>10, 43</sup>. Portanto, as escalas procuram priorizar uma das três dimensões do impacto da doença, que incluem: 1 - a dimensão corporal, que se refere

à estrutura e à função dos sistemas corporais (ex.: hemianopsia, disartria, afasia, perda de força, perda de sensibilidade); 2 - a dimensão das atividades, que diz respeito à capacidade de realizar atividades individuais (ex.: comer, caminhar, vestir-se); 3 - a dimensão participativa, que apresenta relação com as oportunidades e barreiras sociais de cada indivíduo, o envolvimento individual com o meio, o impacto dos déficits na vida social, como no emprego (ex.: hemianopsia para um piloto). Portanto, a repercussão do AVC considerada moderada em um dos domínios pode ser severa quando considerado outro domínio<sup>10, 44, 45</sup>.

No presente estudo, optamos pelo uso das escalas do NIHSS e mRS para avaliação da correlação com os biomarcadores selecionados, pois são amplamente utilizadas no atendimento de pacientes na fase aguda do AVC e no acompanhamento posterior, permitem a mensuração de pelo menos dois dos domínios citados e são comumente aplicadas em estudos científicos. Essas escalas estão apresentadas no final da tese.

A escala do NIHSS é uma escala validada para o uso em "*clinical trials*" e para prática clínica, apresenta alta confiabilidade interobservadores e mensura as perdas neurológicas através de 15 itens de avaliação (pontuação de 0 a 42), incluindo: nível de consciência, movimentos extraoculares, campo visual, função muscular facial, força em extremidades, função sensorial, coordenação (ataxia), linguagem (afasia), fala (disartria) e heminegligência. Esse escore é útil na avaliação rápida e acurada dos déficits neurológicos e de sua severidade, auxilia na definição e na escolha de tratamentos, bem como na predição de desfechos a curto e a longo prazos<sup>10, 11, 43, 45</sup>. Por avaliar mais itens que a maioria das escalas neurológicas, apresenta maior sensibilidade e pode ser usada para monitorização dos pacientes nas primeiras horas e dias após o AVC; nessa situação um aumento de 2 ou mais pontos no escore está associado a piores desfechos e ao aumento da mortalidade<sup>10, 46</sup>. No entanto, apesar de contribuir para identificação da área cerebral isquêmica e mostrar boa correlação com o volume da área infartada por neuroimagem, apresenta limitações importantes na avaliação de pacientes com isquemia em território cerebral vertebrobasilar, como por exemplo em infartos cerebelares que podem ter escores de NIHSS baixos, mas alta gravidade na fase aguda e importante incapacidade como desfecho<sup>10, 45</sup>.

A escala de Rankin desenvolvida na década de 50 e modificada em 1988 (mRS) mensura a independência funcional pós-AVC através da avaliação da perda parcial ou total de capacidades humanas que afetam a função corporal, das atividades

e da participação social do paciente, sendo usada para avaliação global do impacto do AVC em estudos científicos e em intervenções clínicas. É uma escala simples, amplamente validada e confiável, cuja pontuação varia de 0, indicando ausência de sintomas, a 6, morte<sup>10, 47, 48, 49</sup>. Além disso, apresenta boa correlação com o volume cerebral infartado e outros escores neurológicos, como: NIHSS, GOS (*Glasgow Outcome Scale*) e BI (*Barthel Index*)<sup>49</sup>. Análises estatísticas formais em estudos clínicos frequentemente dicotomizam a mRS em bom e mau desfecho funcional com diferentes pontos de corte de acordo com o objetivo da avaliação, aumentando o poder estatístico para a detecção de resultados significativos de tratamentos, mas isso implica perda de sensibilidade e de especificidade, considerando a avaliação individual dos pacientes<sup>10</sup>.

Entender as indicações e as limitações das escalas de AVC é importante para o atendimento de pacientes nas fases aguda e de reabilitação pós-AVC, bem como para a correta interpretação de publicações nessa área<sup>46, 50</sup>. A associação de escalas neurológicas que mensuram diferentes dimensões do comprometimento pela doença, exames de neuroimagem, exames clínicos e laboratoriais pode aumentar a capacidade diagnóstica e preditiva e, conseqüentemente, auxiliar na tomada de decisões<sup>10, 43, 50</sup>.

## **2.4 Biomarcadores**

Os biomarcadores são definidos pelas suas características, as quais devem ser objetivamente medidas e avaliadas como indicadores de um processo biológico normal, de um processo patogênico ou a resposta farmacológica a uma intervenção terapêutica<sup>15</sup>. A maioria dos biomarcadores clínicos é composta por moléculas detectáveis e mensuradas em fluidos ou tecidos corporais representativas da fisiopatologia da doença, mas os exames de imagem também podem receber essa classificação<sup>14, 15</sup>. Idealmente, um biomarcador clínico deve apresentar medidas acuradas, precisas e reprodutíveis, altas sensibilidade e especificidade, facilidade de interpretação, correlação com os achados clínicos e acréscimo de informações aos exames já validados<sup>12, 15</sup>.

A utilização de biomarcadores em doenças vasculares é crescente e, conseqüentemente, há necessidade de conhecer o valor do seu uso na prática clínica<sup>51</sup>. A identificação de biomarcadores para o AVC é uma área de intensa



pesquisa, pois auxiliam no diagnóstico, na determinação da fisiopatologia, na predição da resposta ao tratamento e dos desfechos clínicos<sup>12, 13, 17</sup>.

Apesar da publicação de vários trabalhos nessa área nas últimas décadas e do crescente entendimento da fisiopatologia das doenças cerebrovasculares, ainda não foi encontrado um biomarcador ideal para o AVC, assim como a troponina para a cardiopatia isquêmica ou a creatinina para a insuficiência renal<sup>12</sup>. As razões para isso parecem estar relacionadas à heterogeneidade do AVC, incluindo a etiologia, a localização, o tamanho da área comprometida e os fatores de risco envolvidos<sup>12, 14, 52</sup>. Portanto, busca-se identificar painéis de biomarcadores séricos capazes de fornecer informações relacionadas à fisiopatologia do AVC e à sua evolução, que incluem a aterosclerose, a formação do trombo, a inflamação, o estresse oxidativo, a injúria endotelial, a quebra da barreira hematoencefálica (BHE), as isquemias cerebrais primária e secundária, objetivando o aumento da sensibilidade e da especificidade associada aos métodos de diagnóstico e de avaliação de prognóstico já utilizados<sup>12, 13, 17, 52, 53</sup>. No entanto, muitos dos biomarcadores estão associados a diferentes tipos de injúria cerebral, podendo ser encontrados no AVC isquêmico, no AVC hemorrágico, na hemorragia subaracnóide e no traumatismo cranioencefálico, visto que os processos fisiopatológicos se sobrepõem<sup>12, 13</sup>. Do ponto de vista clínico, prefere-se a dosagem de marcadores séricos comparados aos líquóricos em razão da facilidade das coletas, da possibilidade de coletas seriadas e do menor risco de complicações, mas a BHE pode prejudicar a liberação de biomarcadores cerebrais mais específicos na corrente sanguínea<sup>12, 14, 16</sup>. Por isso, os biomarcadores sanguíneos devem apresentar concentrações plasmáticas representativas do dano neurológico após o comprometimento da BHE e associação com os desfechos clínicos neurológicos<sup>15, 54</sup>.

A lesão cerebral decorrente do AVC é causada pela severa redução ou cessação abrupta do fluxo sanguíneo a um território vascular cerebral, provocando diminuição do fornecimento de energia (hipóxia e privação de glicose) e acúmulo citoplasmático de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^+$ . Consequentemente, é desencadeada uma cascata de eventos moleculares, incluindo a produção de espécies reativas de oxigênio, a ativação de Caspases/Calpain, a inibição da síntese de proteínas, a disfunção mitocondrial, a formação de edema cerebral e a fragmentação de DNA celular, que juntos levam ao dano isquêmico primário. Logo após o início do dano isquêmico cerebral, a micróglia é ativada e citocinas são produzidas, resultando na migração de leucócitos para área afetada<sup>55, 56</sup>. A ativação da micróglia é dividida nos fenótipos:

clássico (M1), que secreta citocinas pró-inflamatórias e exacerba a injúria neuronal, e, por outro lado, alternativo (M2), que promove resposta anti-inflamatória e reparativa, portanto, neuroproteção. A polarização dessas células depende do estágio da doença e é regulada por diferentes vias moleculares e mediadores da ativação micróglia/macrófagos<sup>56, 57</sup>. Além disso, ocorre ativação das células endoteliais da microvasculatura e inflamação vascular com aumento das séries proinflamatórias e dos fatores procoagulantes, como as moléculas de adesão intercelular tipo 1 (ICAM-1), a P-selectina e a matriz de metaloproteinases 9. Subsequentemente, essas moléculas promovem a migração e a adesão de leucócitos periféricos, ativam o sistema de coagulação e contribuem para a perda de integridade da BHE. Dessa forma, a resposta imune local cerebral é exposta à resposta sistêmica que exacerba a primeira e causa dano neuronal secundário<sup>55, 56</sup>. Avanços nas técnicas de imagem molecular por ressonância magnética permitem mostrar a inflamação vascular e a quebra da BHE na fase aguda do AVC, mas atualmente são usadas apenas em pesquisas<sup>58, 59</sup>.

A micróglia é composta por imunócitos de origem mielóide, também consideradas as células de vida mais longa e com maior capacidade de renovação no cérebro<sup>56</sup>. Essas células através de suas finas ramificações, que se estendem e se retraem, inspecionam o seu microambiente, permitem a detecção imediata dos danos cerebrais e remodelam os circuitos neurais, formando conexões sinápticas com neurônios adjacentes saudáveis<sup>56, 57</sup>. Essa interação micróglia-neurônios altera a excitabilidade das conexões neurais, modulando a resposta neuroinflamatória; sendo os substratos dessa comunicação potenciais mensageiros, como citocinas, purinas, prostaglandinas e óxido nítrico<sup>56</sup>. A ativação da micróglia no local da injúria primária reduz gradualmente nas semanas após o AVC, mas podem ser observadas alterações globais e distais por alguns meses<sup>55</sup>.

Várias vias de sinalização contribuem para ativação da micróglia e polarização dos macrófagos nos fenótipos M1 ou M2<sup>56, 57, 61, 62</sup>. O interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) secretado pelos linfócitos T *helper* (Th) 1 é importante na indução dos macrófagos ao fenótipo M1. Através da sinalização de Janus quinase (proteínas tirosina quinase não receptoras intracelulares) JAK1/JAK2, o IFN $\gamma$  ativa o sinal transdutor e ativador do fator transcriptor 1 (STAT1) e aumenta a produção de citocinas pró-inflamatórias, como as interleucinas IL-23, IL-1 $\beta$ , IL-12, o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), fatores

quimiotáticos, espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico (NO). A ativação do fenótipo M1 pode ser desencadeada também por lipopolissacarídeos (LPS) ou por padrões moleculares associados a danos (DAMPs), que incluem altas concentrações extracelulares de ATP, proteínas de decomposição da matriz extracelular, proteínas de choque térmico e *high mobility group box 1 protein* (HMGB1), reconhecidos por receptores tipo Toll (TLR), predominantemente TLR2 e TLR4, seguidos pela formação de complexos ativos que incluem o fator de diferenciação mielóide 88 (My88), o fator nuclear  $\kappa$ B (FN $\kappa$ B), as células imunorreativas p65 e p38 e o fator regulador do interferon 3 (IRF3). Esses complexos, por sua vez, regulam a secreção de mediadores inflamatórios e marcadores de superfície celular das células polarizadas, com alta expressão de IL-12 e IL-23<sup>56, 57, 61</sup>. A ativação dos macrófagos para o fenótipo M2 é frequentemente induzida por IL-4, IL-10 e IL-13. IL-4 e IL-13 combinam-se, respectivamente, aos receptores IL-4R $\alpha$  e IL-13 $\alpha$ 1 para ativar fatores de transcrição, como o fator transcritor 6 (STAT6), o fator regulador do interferon 4 (IRF4) e o receptor ativado por proliferador de peroxissoma  $\gamma$ . Assim, citocinas como IL-10, fator transformador de crescimento  $\beta$  (TGF $\beta$ ), fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) e outros mediadores inflamatórios são liberados, levando à sinalização anti-inflamatória e cicatricial<sup>56, 57, 62</sup>. No entanto, essas vias de sinalização atuam sinergicamente e se sobrepõem em diferentes graus durante a progressão da doença, podendo haver migrações entre os fenótipos M1 e M2<sup>56</sup>.

Várias citocinas e mediadores inflamatórios são produzidos por células imunes infiltrativas e por células cerebrais como resultado da injúria cerebral<sup>55, 60</sup>. Os linfócitos T e os macrófagos parecem aumentar principalmente a partir das primeiras 24 horas com pico por volta do terceiro dia e localizam-se nas áreas isquêmicas, tipicamente próximas aos vasos sanguíneos<sup>60</sup>. A liberação de DAMPs e os demais eventos iniciais após o AVC isquêmico, incluindo a expressão local de citocinas pró-inflamatórias, a adesão leucocitária, a agregação plaquetária e a quebra da BHE, são seguidos pela infiltração de macrófagos, neutrófilos, linfócitos T e linfócitos B<sup>55, 60</sup>. As células T periféricas são compostas por 30-40% de células T auxiliares CD4<sup>+</sup>, 20-30% de células T  $\gamma\delta$  (*gamma-delta T cells*) e 20-30% de células T CD8<sup>+</sup>. As células T CD4<sup>+</sup> são classificadas como Th1, Th2, Th17 e T reguladoras (Treg) com base em seu repertório de citocinas distinto. As células T desempenham papéis importantes na mediação das respostas inflamatórias através da secreção de citocinas efetoras<sup>63</sup>.

As células T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup> e células T  $\gamma\delta$  promovem mais danos aos tecidos, enquanto as células T reguladoras e as células B são consideradas protetoras<sup>64</sup>. A IL-17 é secretada principalmente pelas células T  $\gamma\delta$ , em vez das células Th17, mas a produção de IL-17 a partir das células T  $\gamma\delta$  requer estimulação por IL-1 $\beta$  e IL-23<sup>60, 63</sup>. As células Treg secretam citocinas anti-inflamatórias, IL-10 e TGF $\beta$ , para suprimir a resposta imune, manter a homeostase imunológica e prevenir a autoimunidade. Alguns estudos experimentais sugerem que as células Treg contribuem para a reparação e a recuperação após o AVC e inibem o processo de aterosclerose<sup>63, 65</sup>. A IL-1 $\beta$ , o TNF $\alpha$ , a IL-23 e a IL-12 são produzidas principalmente a partir de macrófagos, células apresentadoras de antígenos<sup>60, 66</sup>. Os receptores *Toll-like* (TLRs) são um tipo essencial de receptores para resposta imune inata e inespecífica a patógenos gerais<sup>60, 66</sup>. Estudos recentes mostraram que TLR2 e TLR4 são essenciais na resposta a lesões estéreis, como a isquemia cerebral<sup>60, 67</sup>. Os TLRs são expressos em leucócitos e células cerebrais, embora se o efeito de TLRs é neurotóxico ou neuroprotetor parece depender das moléculas liberadas pelas células necróticas do cérebro (DAMPs) que os estimulam e ativam<sup>60, 67</sup>. Portanto, a função dessas células infiltrativas ainda não está bem elucidada e também não está claro se um antígeno cerebral específico está envolvido na ativação da infiltração por linfócitos T, visto que a resposta inflamatória pós-isquêmica é dirigida pelo sistema imune inato e essa pode não ser mediada por antígeno. Todavia, alguns estudos sugerem um papel importante no reconhecimento de antígenos por linfócitos T na injúria cerebral, o que poderia ter efeito protetor e reduzir a área isquêmica<sup>60</sup>.

Além da lesão primária causada pelo infarto cerebral e do dano secundário focal decorrente do processo inflamatório, algumas evidências sugerem um comprometimento global cerebral pela inflamação. Esse processo pode ser pelo menos parcialmente explicado pela disseminação dos componentes inflamatórios no líquido e nos espaços extracelulares, podendo estender o dano à substância branca e a áreas cerebrais distantes do infarto<sup>55</sup>. Estudos em humanos e em modelos animais usando exames de neuroimagem, como a tomografia com emissão de pósitrons (PET), e técnicas de eletrofisiologia permitem a comprovação do conceito de diáspise, mostrando que após o AVC ocorrem alterações estruturais e funcionais na conectividade entre áreas cerebrais distantes da lesão primária<sup>68</sup>. Essas alterações iniciam nas primeiras horas após o AVC e persistem por semanas, pois as áreas

remotas nessa situação também podem liberar DAMPs ou mediadores inflamatórios *in situ*, ativar células gliais e recrutar leucócitos, propagando a inflamação cerebral<sup>55</sup>. Portanto, a inflamação cerebral global pode contribuir para neurodegeneração crônica, piorando os desfechos clínicos, como por exemplo por aumento do déficit cognitivo, mas, por outro lado, pode explicar alterações neurológicas não justificadas pela lesão primária<sup>55, 68</sup>.

Para esse trabalho foram selecionados os seguintes biomarcadores séricos, baseados em estudos prévios, que serão discutidos abaixo: receptor desencadeador expresso nas células mielóides tipo 1 (TREM-1), receptor desencadeador expresso nas células mielóides tipo 2 (TREM-2), interleucina-23 (IL-23) e interleucina-17 (IL-17).

#### **2.4.1 Proteínas TREM**

As proteínas TREM são uma família de receptores de superfície celular que participam de diversos processos celulares, incluindo inflamação, coagulação e desenvolvimento neurológico. O cluster TREM localiza-se no cromossomo humano 6p21 e inclui genes que codificam TREM-1 e TREM-2<sup>69</sup>.

O TREM-1 (receptor desencadeador expresso nas células mielóides tipo 1) age amplificando a resposta inflamatória. O domínio transmembrana do TREM-1 possui um resíduo carregado positivamente que medeia a formação de um complexo com o adaptador de sinalização DAP12, ligação obrigatória para expressão de superfície e sinalização do TREM-1<sup>69</sup>. A ativação do TREM-1 causa a liberação de citocinas pró-inflamatórias, a degranulação de neutrófilos e aumenta a fagocitose, além de aumentar a resposta inflamatória quando há um processo infeccioso associado<sup>69, 70</sup>. Estudos funcionais sobre TREM-1 mostraram que sozinho esse biomarcador induz apenas modesta ativação celular e secreção de citocinas pró-inflamatórias, mas age sinergicamente com receptores envolvidos na resposta imune inata cujo efeito neurotóxico e/ou neuroprotetor ainda não está totalmente esclarecido, como TLRs (*Toll-like receptors*) e NLRs (*Nod-like receptors*)<sup>69</sup>. A origem do TREM-1 ainda não foi claramente elucidada, mas parece estar ligada à tradução do RNAm e expressa em neutrófilos, monócitos/macrófagos e algumas células dendríticas<sup>69, 71</sup>.

Alguns polimorfismos genéticos do TREM-1 estão associados à doença aterosclerótica; observou-se expressão aumentada de TREM-1 em lesões

inamatórias ateromatosas comparadas a placas fibrosas e estudos *in vitro* mostraram efeito sinérgico entre TREM-1 e dislipidemia, mas o seu valor como marcador prognóstico ainda é questionável<sup>70, 72, 73</sup>. No entanto, estudos mostraram um aumento das concentrações plasmáticas de TREM-1 após infarto agudo do miocárdico e correlação desses níveis com pior prognóstico (morte e disfunção miocárdica)<sup>74</sup>. Baseados nessas evidências, foram desenvolvidos modelos experimentais com o intuito de testar moduladores/inibidores farmacológicos do TREM-1, como peptídeos sintéticos inibidores, tendo esses trabalhos mostrado redução da área infartada e de fibrose miocárdica intersticial por redução da inflamação e limitação do recrutamento leucocitário, mas ainda sem aplicabilidade clínica para cardioproteção<sup>74, 75</sup>.

Em estudos realizados em pacientes com hemorragia subaracnóide também se observou correlação entre níveis líquidos elevados de TREM-1 e a severidade e o prognóstico da doença avaliada pela escala de *Rankin* durante o primeiro mês após o evento<sup>76, 77</sup>. Pesquisas sugerem que a proteína TREM-1 está envolvida na migração de neutrófilos pelo epitélio e na infiltração por macrófagos na área patológica, como provável explicação para o efeito amplificador da resposta inflamatória observada, sendo uma das citocinas que mais se eleva nos fluidos inflamatórios e em órgãos periféricos, como baço e intestino, após a isquemia cerebral inicial<sup>78, 79</sup>. Outra função potencial do TREM-1 observada em pacientes com Síndrome Antifosfolípideo é a sua expressão na superfície plaquetária após a ativação da resposta imune mediada por TLR4, contribuindo para agregação plaquetária e formação do trombo<sup>80</sup>. Em pacientes com diagnóstico de sepse, síndrome heterogênea provocada pela resposta do sistema imune a uma infecção e que apresenta altas mortalidade e morbidade, a dosagem precoce elevada de TREM-1 no sangue e em outros fluidos corporais, apresenta boa correlação com as escalas clínicas validadas, como *Simplified Acute Physiology Score II* (SAPS II), *Sequential Organ Failure Assessment* (SOFA) e *Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II* (APACHE II), aumentando o valor diagnóstico e prognóstico dos escores<sup>81, 82, 83, 84</sup>.

Apesar disso, esse biomarcador ainda não foi avaliado adequadamente como marcador prognóstico em doenças cerebrovasculares, especialmente no AVC.

O TREM-2 (receptor desencadeador expresso nas células mielóides tipo 2) é um receptor na micróglia/macrófagos com alguma expressão na superfície da membrana celular, pertencente aos receptores da superfamília do tipo imunoglobulina, mas transportado principalmente como proteína solúvel intracelular

pelas paredes ventriculares e pelo plexo coróide e após para o parênquima cerebral via células gliais radiais<sup>69, 85</sup>. O área de ligação ao ligante do tipo imunoglobulina está situado no domínio extracelular, enquanto o domínio transmembrana facilita a interação com o adaptador de sinalização DAP12<sup>57</sup>.

A importância do TREM-2 e sua função na micróglia foi primeiramente estudada na doença de Nasu-Hakola, conhecida como displasia lipomembranosa policística com leucoencefalopatia esclerosante, caracterizada pela presença de cistos ósseos por disfunção de osteoclastos, demência progressiva, convulsões e disfunção motora, onde se diagnosticou mutação ou deleção no gene de TREM-2 ou da proteína DAP12 do adaptador de sinalização (cromossomo 19), importante para sua ativação<sup>57, 85</sup>. A proteína TREM-2 tem papel fundamental na inflamação, induzindo a expressão de receptores de citocinas, a migração celular (células dendríticas e macrófagos) e o aumento da fagocitose, mas não promove a liberação de citocinas inflamatórias, portando com função anti-inflamatória<sup>57, 69, 85</sup>. A ausência de expressão de TREM-2 na micróglia reduz a capacidade de fagocitose e aumenta a produção de citocinas pró-inflamatórias<sup>57, 85</sup>.

Uma ampla revisão recentemente publicada por Gervois e Lambrichts definiu 4 mecanismos da função microglial mediados pelo TREM-2 após o AVC isquêmico: (1) a fagocitose dos neurônios apoptóticos, demonstrando a importância da limpeza dos debris para ocorrência de sinapses e reparo axonal; (2) a capacidade de direcionar o ambiente pró-inflamatório para um ambiente pró-regenerativo, exercendo um efeito neuroprotetor; (3) a possibilidade de inibir a resposta pró-inflamatória mediada por TLR; e (4) a preservação da micróglia, considerando a proliferação celular e a função após a injúria isquêmica<sup>57</sup>. Em um estudo *post-mortem* observou-se expressão celular de TREM-2 na parênquima cerebral de áreas infartadas entre o primeiro e terceiro dias, sugerindo o início do processo fagocítico do tecido necrótico, mas as características celulares sugeriam predominantemente a participação de macrófagos provavelmente recrutados da circulação em relação à micróglia, chamando atenção para importância das células mielóides periféricas e sua função na resposta inflamatória sistêmica<sup>86</sup>.

No entanto, com o aumento da idade parece haver uma redução da expressão de TREM-2, o que acelera a perda neuronal, reduz a atividade da micróglia e favorece a neuroinflamação, afetando a sobrevivência neuronal, essa hipótese foi inicialmente levantada em modelos experimentais da Doença de Alzheimer<sup>85</sup>. Além disso,

desordens genéticas em que se identificou deficiência de TREM-2 também demonstraram déficit neurológico (demência) precoce<sup>69</sup>. Em estudos de placas carotídeas ateroscleróticas pós-endarterectomia, detectou-se expressão aumentada de TREM-1 e reduzida de TREM-2 nos pacientes sintomáticos comparados aos assintomáticos<sup>87</sup>. Modelos animais de isquemia/reperfusão cerebral *in vivo* e *in vitro* mostraram que a expressão reduzida de TREM-2 intensifica a resposta inflamatória, aumenta apoptose neuronal e o volume da área infartada, exacerbando a disfunção neurológica<sup>88, 89</sup>.

Portanto, a proteína TREM-2 parece ser essencial para neurogênese e neuroplasticidade<sup>57, 85</sup>.

#### 2.4.2 Interleucinas

A IL-23 (interleucina 23) é uma citocina produzida primariamente por células dendríticas e macrófagos infiltrantes no tecido isquêmico já no primeiro dia após o insulto cerebral<sup>60, 90</sup>. Ela ativa os linfócitos T, estando envolvida no mecanismo de defesa do hospedeiro contra bactérias, fungos e vírus extracelulares, bem como na patogênese de doenças autoimunes e inflamatórias, através de diferentes vias de reconhecimento de DAMPs (*Damage-Associated Molecular Patterns*), PAMPs (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*) e HAMPs (*Homeostasis-Altering Molecular Processes*)<sup>91, 92</sup>. A IL-23 induz a produção de IL-17 pelos linfócitos T com níveis sanguíneos mais elevados dessa última citocina em torno do terceiro dia após a lesão cerebral<sup>60, 93</sup>. IL-23 pode agravar o dano neuronal, o inchaço dos astrócitos e prejudicar a integridade da BHE por mecanismos ainda não totalmente esclarecidos, mas desencadeados pela privação de oxigênio e glicose<sup>94</sup>. Os astrócitos também constituem uma fonte de IL-23 com maior expressão durante a isquemia cerebral. A IL-23 liberada pelos astrócitos pode estimular a micróglia a produzir IL-17 e outros mediadores inflamatórios como IL-6, proteína inflamatória de macrófagos 2 (CXCL2) e óxido nítrico sintase induzível (iNOS). A micróglia pode produzir IL-23 em resposta à IL-17, constituindo um *loop* autócrino<sup>95</sup>.

Estudos experimentais de neuroinflamação em hemorragia intracerebral demonstraram que macrófagos e linfócitos T periféricos sucessivamente infiltram o cérebro com pico de macrófagos no primeiro dia e de linfócitos T em torno do quarto dia, correspondendo ao aumento da expressão das citocinas IL-23 e IL-17,



respectivamente, elucidando o eixo do dano cerebral secundário pós-AVC hemorrágico<sup>96</sup>. Níveis séricos de alguns biomarcadores, incluindo a IL-23, apresentaram correlação significativa com o volume da lesão cerebral e com os desfechos avaliados pela escala de NIHSS em pacientes com AVC isquêmico<sup>97</sup>.

A Síndrome de Imunodepressão Associada ao AVC (SIDS) que envolve a interação entre o sistema imune celular e os marcadores inflamatórios circulantes ocorre imediatamente após o AVC, caracteriza-se por alteração das porcentagens das subpopulações de linfócitos (diferenciação das células Treg e Th) e dos níveis séricos de citocinas inflamatórias, incluindo o aumento de IL-23, e correlaciona-se com a severidade clínica dessa doença, precedendo as complicações infecciosas que podem ocorrer nos dias subsequentes<sup>97</sup>. No entanto, um estudo realizado em pacientes com hemorragia subaracnóide mostrou aumento expressivo dos níveis séricos de IL-23 no primeiro dia e de IL-17 no sétimo dia após o *ictus*, apresentando correlação significativa com complicações relacionadas ao sangramento subaracnóide (vasoespasmos cerebrais, convulsões, hidrocefalia, isquemia cerebral e déficit neurológico tardio) durante o tempo de internação, mas não houve repercussão prognóstica durante o tempo de observação<sup>98</sup>.

A IL-17 (interleucina 17) é uma citocina cuja função biológica foi recentemente elucidada: contribui para o dano neurológico, o tamanho do infarto e a inflamação pós-isquêmica<sup>99</sup>. Ela é secretada pelos linfócitos T (Th17 e células T  $\gamma\delta$ ) e pode induzir as células estromais (fibroblastos, células endoteliais e epiteliais) a produzir IL-6, IL-8, fator estimulador de colônia de granulócitos e moléculas de adesão intercelulares tipo 1 (ICAM-1)<sup>63, 95, 99, 100</sup>.

Estudos experimentais em animais e em pacientes submetidos à necropsia mostram que essa citocina está aumentada no hemisfério cerebral que apresenta lesão comparado ao hemisfério não afetado em pacientes que apresentaram AVC isquêmico, sugerindo sua participação no processo de injúria isquêmica<sup>100</sup>. Os níveis séricos de IL-17 estão significativamente elevados nos primeiros 7 dias após o evento agudo, havendo uma queda desses níveis nas dosagens realizadas tardiamente (aproximadamente 28 dias). Esses achados parecem estar relacionados à queda da resposta inflamatória na fase tardia (4 semanas) e ao tratamento anti-inflamatório usado no AVC isquêmico (ex.: AAS, clopidogrel, estatinas) que induz a secreção de citocinas anti-inflamatórias por células Treg e reduz a secreção de citocinas pro-

inflamatórias por células Th17 e T  $\gamma\delta$ <sup>63</sup>. Entretanto, pode ocorrer um aumento tardio de IL-17, entre 5 a 15 dias, resultante da neovascularização<sup>100</sup>.

Especula-se que os níveis precoces mais elevados e a persistência de níveis séricos aumentados de IL-17 possam estar associados a piores desfechos por progressão da lesão isquêmica em área de penumbra, e que terapias dirigidas à regulação da cascata inflamatória possam melhorar o prognóstico desses pacientes<sup>63, 95, 99</sup>. A IL-23 foi reportada como essencial na indução da produção de IL-17 pelos linfócitos T e o receptor de IL-17 expresso nas células cerebrais modifica várias respostas inflamatórias no sistema nervoso central, como previamente descrito<sup>60, 95, 101</sup>. A IL-17 também modula a função da barreira epitelial hematoencefálica promovendo a expressão da matriz de metaloproteinases (MMPs) e das ICAM-1, prejudicando dessa forma sua integridade por alteração de permeabilidade da membrana<sup>60, 90</sup>.

A análise de placas ateroscleróticas de pacientes com doença carotídea sintomática (AIT e AVC isquêmico) submetidos à endartectomia mostrou expressão aumentada de IL-17 e seus reguladores positivos IL-21 e IL-23, sugerindo a contribuição dessas citocinas no processo de resposta autoimune crônica desse importante fator de risco cerebrovascular<sup>102</sup>. Considerando ainda o papel da IL-17 na fisiopatologia da aterosclerose, um recente trabalho publicado mostrou que a IL-17 induz a expressão de moléculas de adesão, promove a adesão de monócitos às células endoteliais vasculares e estimula a formação de células espumosas induzida por LDL-ox (lipoproteína de baixa densidade oxidada) através da regulação positiva de LOX-1 (receptor de LDL oxidado semelhante à lectina) em macrófagos ativados, estando fortemente implicado na sua patogênese<sup>103</sup>. Em modelos animais de isquemia/reperfusão cerebral, observou-se aumento dos níveis liquóricos e sanguíneos de IL-17 com picos em torno de 12 horas e 3 dias, respectivamente, favorecendo o conceito de inflamação cerebral global pós-isquêmica<sup>104</sup>.

Assim, a IL-17 parece ser um alvo terapêutico promissor para supressão da cascata inflamatória pós-lesão isquêmica<sup>60</sup>.

### 3. MARCO CONCEITUAL

O AVC isquêmico afeta milhões de pessoas anualmente em todo o mundo, apresenta altas taxas de morbidade e mortalidade e, conseqüentemente, impõe uma enorme carga econômica e social<sup>1, 2, 3</sup>. Apesar dos enormes avanços no entendimento da fisiopatologia da doença, das técnicas diagnósticas e das possibilidades de tratamento, ainda é enorme o número de pessoas que apresentam alto grau de dependência após o AVC<sup>5, 7</sup>.

A partir da década de 80, quando a Organização Mundial de Saúde criou uma classificação para determinar a consequência das doenças aos indivíduos – ICDH, houve a validação e a utilização crescente de escalas para avaliação clínica de pacientes com AVC no intuito de descrever e prever as dimensões do impacto da doença, bem como facilitar a comunicação entre clínicos e pesquisadores. Dentre essas escalas, destacam-se as escalas do NIHSS e a mRS, na mensuração das perdas neurológicas e da independência funcional, respectivamente, com papel na avaliação prognóstica<sup>10, 41, 43</sup>.

Aproximadamente 10 anos depois, intensificaram-se os estudos na busca de biomarcadores para o AVC capazes de auxiliar no diagnóstico, na monitorização do *status* neurológico e na predição de desfechos a curto e a longo prazos<sup>12, 13, 15</sup>. Além disso, o acréscimo de um painel de biomarcadores no acompanhamento dos pacientes neurológicos poderia reduzir as variações interobservadores do exame clínico e acrescentar dados aos exames de imagem e às escalas neurológicas usadas, melhorando a capacidade preditiva das sequelas e auxiliando na tomada de decisões clínicas<sup>15, 17, 18</sup>.

Foram realizados vários estudos experimentais e clínicos nos últimos anos, mas até o momento não foi identificado um grupo de marcadores séricos que substitua os exames clínicos e de imagem ou apresente resultados inequívocos em relação a sua capacidade prognóstica no AVC<sup>12, 14, 15, 17</sup>.

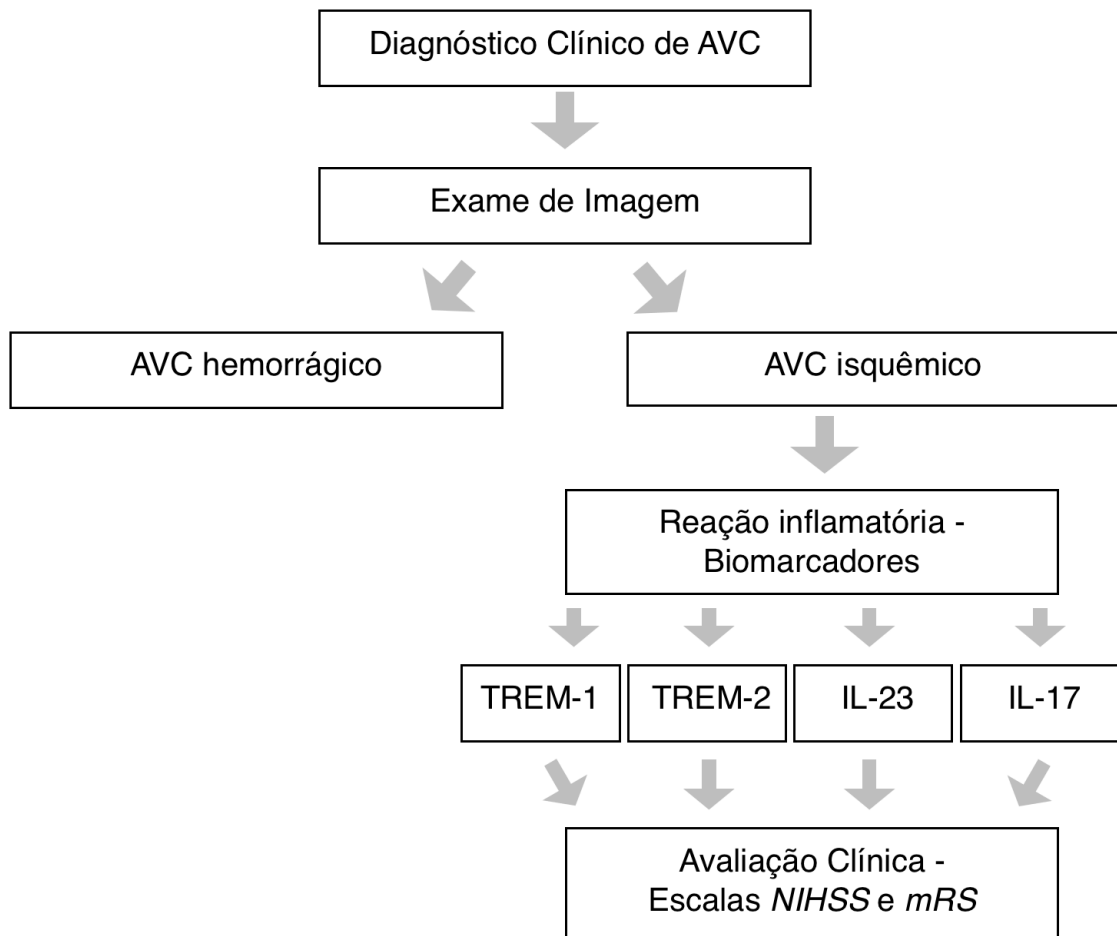


Figura 2: Marco Conceitual

#### 4. JUSTIFICATIVA

O AVC é uma das principais causas de morte e de sequelas neurológicas no mundo. Estima-se que a cada 40 segundos uma pessoa apresente AVC e que ocorra uma morte a cada 4 minutos decorrente dessa doença<sup>1, 3</sup>. A mortalidade nos primeiros 30 dias após o AVC isquêmico é de aproximadamente 10%, de 20% ao final do primeiro ano e em torno de 40% em 5 anos, sendo principalmente relacionada às sequelas neurológicas. Embora as taxas de mortalidade global ajustadas por idade tenham diminuído nos últimos 20 anos, o número absoluto de pessoas que sofrem AVC anualmente, bem como as mortes relacionadas e os anos de vida perdidos ajustados por incapacidade aumentaram<sup>1</sup>. O AVC também parece acelerar o declínio funcional natural relacionado à idade avaliado pelas escalas de AVC<sup>1</sup>. A maioria dos pacientes que sobrevivem à fase aguda do AVC apresentam déficits neurológicos que necessitam de reabilitação e aproximadamente 50% a 70% não recuperam sua independência funcional. Consequentemente, os custos do tratamento destes pacientes são elevados<sup>1, 5</sup>.

A gravidade do AVC e o grau de dependência funcional dos pacientes após o AVC pode ser mensurado através de escalas durante o tempo de acompanhamento, como a do NIHSS e a mRS, as quais podem auxiliar também na predição dos desfechos neurológicos<sup>9, 10, 11</sup>. No entanto, apesar de validadas e amplamente usadas clínica e cientificamente, essas escalas apresentam variação de confiabilidade intra e interobservadores<sup>45, 47, 49</sup>. Ademais, nenhuma medida isolada descreve ou prediz todas as dimensões da recuperação e da incapacidade após o AVC<sup>10, 49</sup>.

Apesar do AVC isquêmico ser uma doença complexa, sabe-se que a inflamação está fortemente implicada na sua fisiopatologia e na ocorrência dos danos neurológicos secundários<sup>15, 105</sup>. Portanto, a identificação de biomarcadores envolvidos nesse processo que apresentem boa correlação com as escalas já usadas e com os exames de neuroimagem pode aumentar a capacidade de prever a evolução neurológica dos pacientes após um AVC<sup>12, 13, 15</sup>.

A identificação de um painel de biomarcadores que preencha esses objetivos auxiliará na tomada de decisões referente aos potenciais tratamentos, na escolha das medidas de reabilitação e na previsão dos custos relacionados à doença.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo primário

O objetivo do estudo foi determinar se há correlação entre um painel de biomarcadores composto por TREM-1, TREM-2, IL-23 e IL-17, obtido através da coleta de amostras sanguíneas nas primeiras 24 horas, no terceiro e no quinto dias após o AVC, com as escalas do NIHSS e mRS, realizadas nos mesmos momentos e na alta hospitalar.

### 5.2 Objetivos secundários

Outros objetivos incluem:

- Determinar o intervalo de tempo que apresenta melhor correlação dos biomarcadores dosados com os desfechos neurológicos, avaliados através das escalas de AVC na alta hospitalar e após 4 anos.
- Determinar se os biomarcadores dosados são preditivos dos desfechos neurológicos.
- Determinar se as dosagens dos biomarcadores são diferentes entre os pacientes que apresentam diferentes desfechos neurológicos.
- Determinar se há associação entre as dosagens dos biomarcadores e o tempo de internação hospitalar.
- Determinar se há correlação entre os biomarcadores selecionados e o tamanho da área cerebral isquêmica (lacunar x segmentar) avaliada por TC de crânio.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Benjamin EJ, Muntner P, Alonso A, Bittencourt MS, Callaway CW, Carson AP, et al; American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart Disease and Stroke Statistics-2019 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2019 Mar; 139(10): e56-e528.
2. Thrift AG, Thayabaranathan T, Howard G, Howard VJ, Rothwell PM, Feigin VL, et al. Global stroke statistics. *Int J Stroke*. 2017 Jan; 12(1): 13-32.
3. Dados disponíveis em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>. Acesso em 10 de outubro de 2019.
4. Kasper D, Fauci F, Hauser S, Longo D, Jameson J, Loscalzo J. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 19<sup>th</sup> ed. McGraw-Hill; 2015.
5. Lee K. *The NeuroICU Book*. 2<sup>nd</sup> ed. New York, US: McGraw-Hill; 2018.
6. Layon AJ, Gabrielli A, Yu M, Wood KE. *Civetta, Taylor, & Kirby's Critical Care Medicine*. 5<sup>th</sup> ed. Wolters Kluwer; 2018.
7. Irwin SR, Rippe JM. *Irwin & Rippe's Intensive Care Medicine*. 8<sup>th</sup> ed. Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins; 2018.
8. Daroff RB, Jankovic J, Mazziotta JC, Pomeroy SL. *Bradley's Neurology in Clinical Practice*. 6<sup>th</sup> ed. Elsevier; 2016.
9. Asplund K. Clinimetrics in stroke research. *Stroke*. 1987 Mar-Apr; 18(2): 528-530.
10. Kasner SE. Clinical interpretation and use of stroke scales. *Lancet Neurol*. 2006 Jul; 5(7): 603-612.
11. Sucharew H, Khoury J, Moomaw CJ, Alwell K, Kissela BM, Belagaje S, et al. Profiles of the National Institutes of Health Stroke Scale items as a predictor of patient outcome. *Stroke*. 2013 Aug; 44(8): 2182-2187.
12. Jickling GC, Sharp FR. Biomarker panels in ischemic stroke. *Stroke*. 2015 Mar; 46(3): 915-920.
13. Hasan N, McColgan P, Bentley P, Edwards RJ, Sharma P. Towards the identification of blood biomarkers for acute stroke in humans: a comprehensive systematic review. *Br J Clin Pharmacol*. 2012 Aug; 74(2): 230-240.
14. Raman K, Paré G. Of stroke and biomarkers: the elusive quest for a clinical biomarker panel. *Clin Biochem*. 2013 Jun; 46(9):705-706.

15. Simats A, García-Berrocoso T, Montaner J. Neuroinflammatory biomarkers: From stroke diagnosis and prognosis to therapy. *Biochim Biophys Acta*. 2016 Mar; 1862(3): 411-424.
16. Schaarschmidt H, Prange HW, Reiber H. Neuron-specific enolase concentrations in blood as a prognostic parameter in cerebrovascular diseases. *Stroke*. 1994 Mar; 25(3): 558-565.
17. Whiteley W, Chong WL, Sengupta A, Sandercock P. Blood markers for the prognosis of ischemic stroke: a systematic review. *Stroke*. 2009 May; 40(5): e380-389.
18. Dieplinger B, Bocksrucker C, Egger M, Eggers C, Haltmayer M, Mueller T. Prognostic Value of Inflammatory and Cardiovascular Biomarkers for Prediction of 90-Day All-Cause Mortality after Acute Ischemic Stroke-Results from the Linz Stroke Unit Study. *Clin Chem*. 2017 Jun; 63(6): 1101-1109.
19. Powers WJ, Rabinstein AA, Ackerson T, Adeoye OM, Bambakidis NC, Becker K, et al; American Heart Association Stroke Council. 2018 Guidelines for the Early Management of Patients With Acute Ischemic Stroke. A Guideline for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*. 2018 Mar; 49(3): e46-e110; Erratum in: e138.
20. Silva CIS, D'Ippolito G, Rocha AJ. *Encéfalo. Série Colégio Brasileiro de Radiologia e Diagnóstico por Imagem*. 1st ed. Rio de Janeiro RJ: Elsevier Editora; 2012.
21. Barber PA, Hill MD, Eliasziw M, et al. Imaging of the brain in acute ischemic stroke: Comparison of computed tomography and magnetic resonance diffusion-weighted imaging. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2005 Nov; 76(11): 1528-1533.
22. Ezzedine MA, Lev MH, MacDonald CT, et al. CT angiography with whole brain perfused blood imaging: added clinical value in the assessment of acute stroke. *Stroke*. 2002 Apr; 33(4): 959-966.
23. Potter CA, Vagal AS, Goyal M, Nunez DB, Leslie-Mazwi TM, Lev MH. CT for Treatment Selection in Acute Ischemic Stroke: A Code Stroke Primer. *Radiographics*. 2019 Oct; 39(6): 1717-1738.
24. Menon BK, Campbell BC, Levi C, Goyal M. Role of Imaging in Current Acute Ischemic Stroke Workflow for Endovascular Therapy *Stroke*. 2015 Jun; 46(6): 1453-1461.
25. Bornstein NM. *Stroke: Practical Guide for Clinicians*. Karger, 2009.
26. Adams HP Jr, Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, 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*. 1993 Jan; 24(1): 35-41.



27. National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *N Engl J Med.* 1995 Dec 14; 333(24): 1581-1587.
28. Hacke W, Kaste M, Bluhmki E, Brozman M, Dávalos A, Guidetti D, et al. Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N Engl J Med.* 2008 Sep; 359(13): 1317-1329.
29. Ma H, Campbell BCV, Parsons MW, Churilov L, Levi CR, Hsu C, et al. Thrombolysis Guided by Perfusion Imaging up to 9 Hours after Onset of Stroke. *N Engl J Med.* 2019 May; 380(19): 1795-1803.
30. Berkhemer OA, Fransen PS, Beumer D, van den Berg LA, Lingsma HF, Yoo AJ, et al. A Randomized Trial of Intraarterial Treatment for Acute Ischemic Stroke. *Engl J Med.* 2015 Jan; 372(1): 11-20.
31. Goyal M, Demchuk AM, Menon BK, Eesa M, Rempel JL, Thornton J, et al. Randomized assessment of rapid endovascular treatment of ischemic stroke. *N Engl J Med.* 2015 Mar; 372(11): 1019-1030.
32. Campbell BC, Mitchell PJ, Kleinig TJ, Dewey HM, Churilov L, Yassi N, et al. Endovascular therapy for ischemic stroke with perfusion-imaging selection. *N Engl J Med.* 2015 Mar; 372 (11): 1009-1018.
33. Jovin TG, Chamorro A, Cobo E, de Miquel MA, Molina CA, Rovira A, et al. Thrombectomy within 8 hours after symptom onset in ischemic stroke. *N Engl J Med.* 2015 Jun; 372(24): 2296-2306.
34. Saver JL, Goyal M, Bonafe A, Diener HC, Levy EI, Pereira VM, et al. Stent-retriever thrombectomy after intravenous t-PA vs. t-PA alone in stroke. *N Engl J Med.* 2015 Jun; 372(24): 2285-2295.
35. S. Martins, F. Mont'Alvern, O. Pontes-Neto, L.C. Rebello, G. S. Silva, F. Lima, et al. Randomization of endovascular treatment with stent-retriever and/ or thromboaspiration vs. best medical therapy in acute ischemic stroke due to large vessel occlusion trial (RESILIENT): Final Results. *European Stroke J.* 2019 May, Vol. 4(1S) 779–789. ESOC19-2403.
36. Vahedi K, Vicaut E, Mateo J, Kurtz A, Orabi M, Guichard JP, et al. Sequential-design, multicenter, randomized, controlled trial of early decompressive craniectomy in malignant middle cerebral artery infarction (DECIMAL Trial). *Stroke.* 2007 Sep; 38(9): 2506-2517.
37. Jüttler E, Schwab S, Schmiedek P, Unterberg A, Hennerici M, Woitzik J, et al. Decompressive Surgery for the Treatment of Malignant Infarction of the Middle Cerebral Artery (DESTINY): a randomized, controlled trial. *Stroke.* 2007 Set; 38(9): 2518-2525.
38. Hofmeijr J, Kappelle LJ, Algra A, Amelink GJ, van Gijn J, van der Worp HB; HAMLET investigators. Surgical decompression for space-occupying cerebral

infarction (the Hemicraniectomy After Middle Cerebral Artery infarction with Life-threatening Edema Trial [HAMLET]): a multicentre, open, randomised trial. *Lancet Neurol.* 2009 Apr; 8(4): 326-333.

39. Layon AJ, Gabrielle A, Friedman WA. *Textbook of Neurointensive Care*. 2<sup>nd</sup> ed. Springer; 2013.
40. Granger CV, Gresham GE. International Classification of Impairments, Disabilities, and Handicaps (ICIDH) as a conceptual basis for stroke outcome research. A tribute to Philip HN. Wood. *Stroke.* 1990 Sep; 21(9 Suppl): II66-67.
41. Simeonsson RJ, Lollar D, Hollowell J, Adams M. *J Clin Epidemiol.* Revision of the International Classification of Impairments, Disabilities, and Handicaps: Developmental issue. 2000 Feb; 53(2): 113-124.
42. Iezzoni LI, Marsella SA, Lopinsky T, Heaphy D, Warsett KS. Do prominent quality measurement surveys capture the concerns of persons with disability? *Disabil Health J.* 2017 Apr; 10(2): 222-230.
43. Leifer D, Bravata DM, Connors JJ 3rd, Hinchey JA, Jauch EC, Johnston SC, et al; American Heart Association Special Writing Group of the Stroke Council; Atherosclerotic Peripheral Vascular Disease Working Group; Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia; Council on Cardiovascular Nursing. Metrics for measuring quality of care in comprehensive stroke centers: detailed follow-up to Brain Attack Coalition comprehensive stroke center recommendations: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke.* 2011 Mar; 42(3): 849-877.
44. Bouffouix E, Arnould C, Thonnard JL. Satisfaction with activity and participation and its relationships with body functions, activities, or environmental factors in stroke patients. *Arch Phys Med Rehabil.* 2011 Sep; 92(9): 1404-1410.
45. Brott T, Adams HP Jr, Olinger CP, Marler JR, Barsan WG, Biller J, et al. Measurements of acute cerebral infarction: a clinical examination scale. *Stroke.* 1989 Jul; 20(7): 864-870.
46. Siegler JE, Boehme AK, Kumar AD, Gillette MA, Albright KC, Martin-Schild S. What change in the National Institutes of Health Stroke Scale should define neurologic deterioration in acute ischemic stroke? *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2013 Jul; 22(5): 675-682.
47. van Swieten JC, Koudstaal PJ, Visser MC, Schouten HJ, van Gijn J. Interobserver agreement for the assessment of handicap in stroke patients. *Stroke.* 1988 May; 19(5): 604-607.
48. de Haan R, Limburg M, Bossuyt P, van der Meulen J, Aaronson N. The clinical meaning of Rankin 'handicap' grades after stroke. *Stroke.* 1995 Nov; 26(11): 2027-2030.

49. Lees KR, Bath PM, Schellinger PD, Kerr DM, Fulton R, Hacke W, et al; European Stroke Organization Outcomes Working Group. Contemporary outcome measures in acute stroke research: choice of primary outcome measure. *Stroke*. 2012 Apr; 43(4): 1163-1170.
50. Wang J, Yu XD, Li GQ. Comparative study on short-term and long-term prognostic determinants in patients with acute cerebral infarction. *Int J Clin Exp Med*. 2015 Jun 15; 8(6): 9855-9861.
51. Hlatky MA, Greenland P, Arnett DK, Ballantyne CM, Criqui MH, Elkind MS, et al; American Heart Association Expert Panel on Subclinical Atherosclerotic Diseases and Emerging Risk Factors and the Stroke Council. Criteria for evaluation of novel markers of cardiovascular risk: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*. 2009 May; 119(17): 2408-2416.
52. An SA, Kim J, Kim OJ, Kim JK, Kim NK, Song J, et al. Limited clinical value of multiple blood markers in the diagnosis of ischemic stroke. *Clin Biochem*. 2013 Jun; 46(9): 710-715.
53. Whiteley W, Wardlaw J, Dennis M, Lowe G, Rumley A, Sattar N, et al. The use of blood biomarkers to predict poor outcome after acute transient ischemic attack or ischemic stroke. *Stroke*. 2012 Jan; 43(1): 86-91.
54. Reynolds MA, Kirchick HJ, Dahlen JR, Anderberg JM, McPherson PH, Nakamura KK, et al. Early biomarkers of stroke. *Clin Chem*. 2003 Oct; 49(10): 1733-1739.
55. Shi K, Tian DC, Li ZG, Ducruet AF, Lawton MT, Shi FD. Global brain inflammation in stroke. *Lancet Neurol*. 2019 Nov; 18(11): 1058-1066.
56. Zhao SC, Ma LS, Chu ZH, Xu H, Wu WQ, Liu F. Regulation of microglial activation in stroke. *Acta Pharmacol Sin*. 2017 Apr; 38(4): 445-458.
57. Gervois P, Lambrichts. The Emerging Role of Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 2 as a Target for Immunomodulation in Ischemic Stroke. *Front Immunol*. 2019 Jul 17; 10: 1668-1675.
58. Gauberti M, Fournier AP, Docagne F, Vivien D, Martinez de Lizarrondo S. Molecular Magnetic Resonance Imaging of Endothelial Activation in the Central Nervous System. *Theranostics*. 2018 Feb; 8(5): 1195-1212.
59. Villringer K, Sanz Cuesta BE, Ostwaldt AC, Grittner U, Brunecker P, Khalil AA, et al. DCE-MRI blood-brain barrier assessment in acute ischemic stroke. *Neurology*. 2017 Jan; 88(5): 433-440.
60. Shichita T, Sakaguchi R, Suzuki M, Yoshimura A. Post-ischemic inflammation in the brain. *Front Immunol*. 2012 May; 3: 132-138.
61. Cao L, He C. Polarization of macrophages and microglia in inflammatory demyelination. *Neurosci Bull*. 2013 Apr; 29(2): 189-198.

62. Martinez FO, Helming L, Gordon S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu Rev Immunol.* 2009; 27: 451-483.
63. Hu Y, Zheng Y, Wu Y, Ni B, Shi S. Imbalance between IL-17A-producing cells and regulatory T cells during ischemic stroke. *Mediators Inflamm.* 2014; 2014: 81345-81352.
64. Gelderblom M, Weymar A, Bernreuther C, Velden J, Arunachalam P, Steinbach K, et al. Neutralization of the IL-17 axis diminishes neutrophil invasion and protects from ischemic stroke. *Blood.* 2012 Nov; 120(18): 3793-3802.
65. Li Q, Wang Y, Yu F, Wang YM, Zhang C, Hu C, et al. Peripheral Th17/Treg imbalance in patients with atherosclerotic cerebral infarction. *Int J Clin Exp Pathol.* 2013 May; 6(6):1015-1027.
66. Abbas A, Gregersen I, Holm S, Daissormont I, Bjerkeli V, Krohg-Sørensen K, et al. Interleukin 23 levels are increased in carotid atherosclerosis: possible role for the interleukin 23/interleukin 17 axis. *Stroke.* 2015 Mar; 46(3): 793-799.
67. Chen CJ, Kono H, Golenbock D, Reed G, Akira S, Rock KL. Identification of a key pathway required for the sterile inflammatory response triggered by dying cells. *Nat Med.* 2007 Jul; 13(7): 851-856.
68. Carrera E, Tononi G. Diaschisis: past, present, future. *Brain.* 2014 Sep; 137(Pt 9): 2408-2422.
69. Klesney-Tait J, Turnbull IR, Colonna M. The TREM receptor family and signal integration. *Nat Immunol.* 2006 Dec; 7(12): 1266-1273.
70. Golovkin AS, Ponasenko AV, Khutornaya MV, Kutikhin AG, Salakhov RR, Yuzhalin AE, et al. Association of TLR and TREM-1 gene polymorphisms with risk of coronary artery disease in a Russian population. *Gene.* 2014 Oct 15; 550(1): 101-109.
71. Joffre J, Ait-Oufella H. Targeting the immune response in atherosclerosis: It's time for clinical trials! *Arch Cardiovasc Dis.* 2017 Dec; 110(12): 643-645.
72. Zysset D, Weber B, Rihs S, Brasseit J, Freigang S, Riether C, et al. TREM-1 links dyslipidemia to inflammation and lipid deposition in atherosclerosis. *Nat Commun.* 2016 Oct 20; 7: 13151-13166.
73. Solanki A, Bhatt LK, Johnston TP. Evolving targets for the treatment of atherosclerosis. *Pharmacol Ther.* 2018 Jul; 187: 1-12.
74. Jérémie L, Amir B, Marc D, Sébastien G. The Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells-1: A new player during acute myocardial infarction. *Pharmacol Res.* 2015 Oct; 100: 261-265.
75. Wang F, Li C, Ding FH, Shen Y, Gao J, Liu ZH, et al. Increased serum TREM-1 level is associated with in-stent restenosis, and activation of TREM-1 promotes

- inflammation, proliferation and migration in vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis*. 2017 Dec; 267: 10-18.
76. Sun XG, Ma Q, Jing G, Wang GQ, Hao XD, Wang L. Increased levels of soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in cerebrospinal fluid of subarachnoid hemorrhage patients. *J Clin Neurosci*. 2017 Jan; 35: 139-143.
  77. Sun XG, Ma Q, Jing G, Wang L, Hao XD, Wang GQ. Early elevated levels of soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in subarachnoid hemorrhage patients. *Neurol Sci*. 2017 May; 38(5): 873-877.
  78. Maione F, Iqbal AJ, Raucci F, Letek M, Bauer M, D'Acquisto F. Repetitive Exposure of IL-17 Into the Murine Air Pouch Favors the Recruitment of Inflammatory Monocytes and the Release of IL-16 and TREM-1 in the Inflammatory Fluids. *Front Immunol*. 2018 Nov 30; 9: 2752-2764.
  79. Liu Q, Johnson EM, Lam RK, Wang Q, Bo Ye H, Wilson EN, et al. Peripheral TREM1 responses to brain and intestinal immunogens amplify stroke severity. *Nat Immunol*. 2019 Aug; 20(8): 1023-1034.
  80. Edel Y, Kliminski V, Pokroy-Shapira E, Oren S, Dortort Lazar A, Pri-Paz Basson Y, et al. Elevated plasma level of soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 is associated with inflammation activity and is a potential biomarker of thrombosis in primary antiphospholipid syndrome. *Arthritis Res Ther*. 2019 Jan 7; 21(1): 10-19.
  81. Jiyong J, Tiancha H, Wei C, Huahao S. Diagnostic value of the soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in bacterial infection: a meta-analysis. *Intensive Care Med*. 2009 Apr; 35(4): 587-595.
  82. Sandquist M, Wong HR. Biomarkers of sepsis and their potential value in diagnosis, prognosis and treatment. *Expert Rev Clin Immunol*. 2014 Oct; 10(10): 1349-1356.
  83. Charles PE, Noel R, Massin F, Guy J, Bollaert PE, Quenot JP, et al. Significance of soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 elevation in patients admitted to the intensive care unit with sepsis. *BMC Infect Dis*. 2016 Oct; 16(1): 559-570.
  84. Jedynak M, Siemiatkowski A, Mroczko B, Groblewska M, Milewski R, Szmitkowski M. Soluble TREM-1 Serum Level can Early Predict Mortality of Patients with Sepsis, Severe Sepsis and Septic Shock. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2018 Aug; 66(4): 299-306.
  85. Raha AA, Henderson JW, Stott SR, Vuono R, Foscarin S, Friedland RP, et al. Neuroprotective Effect of TREM-2 in Aging and Alzheimer's Disease Model. *J Alzheimers Dis*. 2017; 55(1): 199-217.

86. Fahrenhold M, Rakic S, Classey J, Brayne C, Ince PG, Nicoll JAR, et al. TREM2 expression in the human brain: a marker of monocyte recruitment? *Brain Pathol.* 2018 Sep; 28(5): 595-602.
87. Rai V, Rao VH, Shao Z, Agrawal DK. Dendritic Cells Expressing Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-1 Correlate with Plaque Stability in Symptomatic and Asymptomatic Patients with Carotid Stenosis. *PLoS One.* 2016 May 5; 11(5): e0154802.
88. Kawabori M, Kacimi R, Kauppinen T, Calosing C, Kim JY, Hsieh CL, et al. Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 2 (TREM2) Deficiency Attenuates Phagocytic Activities of Microglia and Exacerbates Ischemic Damage in Experimental Stroke. *J Neurosci.* 2015 Feb; 35(8): 3384-3396.
89. Wu R, Li X, Xu P, Huang L, Cheng J, Huang X, et al. TREM2 protects against cerebral ischemia/reperfusion injury. *Mol Brain.* 2017 Jun; 10(1): 20-32.
90. Rich RR, Fleisher TA, Shearer WT, Shoroeder Jr HW, Frew AJ, Weyand CM. *Clinical Immunology Principles and Practice.* 4<sup>th</sup> ed. Elsevier; 2015.
91. Hashkes PJ, Laxer RM, Simon A. *Textbook of Autoinflammation.* Springer; 2019.
92. Gelderblom M, Arunachalam P, Magnus T.  $\gamma\delta$  T cells as early sensors of tissue damage and mediators of secondary neurodegeneration. *Front Cell Neurosci.* 2014 Nov; 8: 368-372.
93. Gelderblom M, Gallizioli M, Ludewig P, Thom V, Arunachalam P, Rissiek B, et al. IL-23 (Interleukin-23)-Producing Conventional Dendritic Cells Control the Detrimental IL-17 (Interleukin-17) Response in Stroke. *Stroke.* 2018 Jan; 49(1): 155-164.
94. Wang M, Zhong D, Zheng Y, Li H, Chen H, Ma S, et al. Damage effect of interleukin (IL)-23 on oxygen-glucose-deprived cells of the neurovascular unit via IL-23 receptor. *Neuroscience.* 2015 Mar; 289: 406-416.
95. Swardfager W, Winer DA, Herrmann N, Winer S, Lanctôt KL. Interleukin-17 in post-stroke neurodegeneration. *Neurosci Biobehav Rev.* 2013 Mar; 37(3): 436-447.
96. Zhong Q, Zhou K, Liang QL, Lin S, Wang YC, Xiong XY, et al. Interleukin-23 Secreted by Activated Macrophages Drives  $\gamma\delta$ T Cell Production of Interleukin-17 to Aggravate Secondary Injury After Intracerebral Hemorrhage. *J Am Heart Assoc.* 2016 Oct; 5(10): e004340.
97. Jiang C, Kong W, Wang Y, Ziai W, Yang Q, Zuo F, et al. Changes in the cellular immune system and circulating inflammatory markers of stroke patients. *Oncotarget.* 2017 Jan; 8(2): 3553-3567.

98. Chaudhry SR, Güresir E, Vatter H, Kinfe TM, Dietrich D, Lamprecht A, et al. Aneurysmal subarachnoid hemorrhage lead to systemic upregulation of IL-23/IL-17 inflammatory axis. *Cytokine*. 2017 Sep; 97: 96-103.
99. Shekar S, Cunningham MW, Pabbidi MR, Wang S, Booz GW, Fan F. Targeting vascular inflammation in ischemic stroke: Recent developments on novel immunomodulatory approaches. *Eur J Pharmacol*. 2018 Aug; 833: 531-544.
100. Li GZ, Zhong D, Yang LM, Sun B, Zhong ZH, Yin YH, et al. Expression of interleukin-17 in ischemic brain tissue. *Scand J Immunol*. 2005 Nov; 62(5):481-486.
101. Shichita T, Sugiyama Y, Ooboshi H, Sugimori H, Nakagawa R, Takada I, et al. Pivotal role of cerebral interleukin-17-producing gammadeltaT cells in the delayed phase of ischemic brain injury. *Nat Med*. 2009 Aug; 15(8): 946-950.
102. Erbel C, Dengler TJ, Wangler S, Lasitschka F, Bea F, Wambsganss N, et al. Expression of IL-17A in human atherosclerotic lesions is associated with increased inflammation and plaque vulnerability. *Basic Res Cardiol*. 2011 Jan; 106(1): 125-134.
103. Shiotsugu S, Okinaga T, Habu M, Yoshiga D, Yoshioka I, Nishihara T, et al. The Biological Effects of Interleukin-17A on Adhesion Molecules Expression and Foam Cell Formation in Atherosclerotic Lesions. *J Interferon Cytokine Res*. 2019 Nov; 39(11): 694-702.
104. Li S, Dai Q, Yu J, Liu T, Liu S, Ma L, et al. Identification of IL-17A-derived neural cell type and dynamic changes of IL-17A in serum/CSF of mice with ischemic stroke. *Neurol Res*. 2017 Jun; 39(6): 552-558.
105. Wang Q, Tang XN, Yenari MA. The inflammatory response in stroke. *J Neuroimmunol*. 2007 Mar; 184(1-2): 53-68.

## 7. ARTIGO 1

### **Biomarkers in the prognostic evaluation of ischemic stroke:**

#### **Is there benefit in the measurements of TREM-1 and TREM-2 in the acute phase?**

Authors: Backes FN<sup>1</sup>, Souza A<sup>2</sup>, Bianchin MM<sup>3</sup>

<sup>1</sup> PhD candidate at Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) and intensivist at the Intensive Care Unit of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Rua Ramiro Barcelos 2350, CEP 90035-903, Porto Alegre, RS, Brazil, Tel.: +55-51-21018000. Email: fabianebackes@gmail.com

<sup>2</sup> Professor at School of Pharmacy of Centro Universitário Unilasalle, Rua Victor Barreto 2288, CEP 92010-903, Canoas, RS, Brazil, Tel.: +55-51-81975718. Email: andressasz@gmail.com

<sup>3</sup> Professor at School of Medicine of Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) and Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Rua Ramiro Barcelos 2350, CEP 90035-903, Porto Alegre, RS, Brazil, Tel.: +55-51-21018000. Email: mmbianchin@hotmail.com



## Abstract

**Background and Purpose:** Stroke is a complex process in which initial cerebral ischemia is followed by secondary injury from innate and adaptive immune responses. Cerebral ischemia causes the release of highly immunogenic components or damage-associated molecular patterns (DAMPs) from the brain into the systemic circulation. These DAMPs activate and recruit peripheral immune cells to injured brain regions. As a consequence, toxic or proinflammatory and protective or anti-inflammatory processes are activated after stroke. We report the results of a study focused on the evaluation of serum levels of triggering receptors expressed on myeloid cells (TREM proteins), a family of cell surface receptors that participate in a variety of cellular processes and are activated almost immediately after the onset of brain ischemia, to determine their prognostic value and association with validated stroke scales.

**Material and Methods:** We investigated 50 patients with acute ischemic stroke who were admitted within 24 hours of event onset at the intensive care unit or neurovascular emergency unit of the Hospital de Clínicas. All patients provided venous blood samples for the measurement of triggering receptor expressed on myeloid cells type 1 (TREM-1) and type 2 (TREM-2) within 24 hours of the acute event and on the third and fifth days after the stroke. Neurological stroke severity and global disability were determined with the National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS) and modified Rankin Scale (mRS) at the same three times and at the time of hospital discharge. After four years the patients were reevaluated using the mRS. The patients were subdivided into two groups according to the NIHSS score (NIHSS  $\leq 6$  and NIHSS  $> 6$ ) and the mRS score (mRS  $\leq 2$  and mRS  $> 2$ ), which were employed as neurological outcome measures.

**Results:** The mortality rate reached 28% after four years. TREM-1 and TREM-2 levels were elevated in stroke patients compared to healthy controls with the same risk factors. Analyzing the correlations between these biomarkers and stroke scales, TREM-1 exhibited correlations with NIHSS and mRS within 24 hours (NIHSS and TREM-1:  $p=0.029$ ; mRS and TREM-1:  $p=0.023$ ). The serum level of TREM-1 within 24 hours also presented the best correlation with the neurological outcomes at hospital discharge (NIHSS and TREM-1:  $p=0.021$ ; mRS and TREM-1:  $p=0.049$ ). Both neurologic scores showing favorable outcome (NIHSS  $\leq 6$  and mRS  $\leq 2$ ) at hospital discharge were correlated with the TREM-1 protein concentration within 24 hours, with

low predictive value. The serum concentrations of TREM-1 protein within 24 hours after stroke was significantly higher in patients with poor outcome (mRS > 2) at hospital discharge ( $p=0.021$ ).

**Conclusion:** Blood biomarkers may be useful in acute stroke by suggesting stroke severity, correlating with clinical findings, or providing prognostic value. In this study, TREM-1 was found to be the best prognostic biomarker.

**Keywords:** cerebral ischemic stroke, blood biomarkers, outcome, triggering receptor expressed on myeloid cells type 1 (TREM-1), triggering receptor expressed on myeloid cells type 2 (TREM-2).

## Introduction

Acute ischemic stroke is the most prevalent neurological emergency in most countries and a leading cause of morbidity and mortality worldwide. The majority of stroke survivors suffer from some form of residual disability, and a considerable proportion of these patients will nonetheless regain functional independence<sup>1</sup>.

Ischemic stroke is characterized by a variety of conditions in which blood flow to the brain is reduced or completely blocked, including reduced systemic perfusion, severe stenosis, or vascular occlusion<sup>2</sup>. The tissue damage caused by ischemia initiates a cascade of pathophysiological processes such as inflammation, hemostasis, and neuronal and glial injury that can lead to neuronal death<sup>3</sup>. The diagnosis of cerebral ischemia is clinical and is confirmed by imaging, computed tomography (CT) or magnetic resonance (MR). The identification of biomarkers involved in the neuronal damage process may aid in the diagnosis and increase the prognostic capacity of the methods used, through correlation with the stroke scales and imaging tests<sup>4</sup>.

Despite advances in the treatment of ischemic stroke, including intravenous techniques limited by a narrow therapeutic window (recently extended to 9 hours in patients who have hypoperfused but salvageable brain tissue detected on automated perfusion images)<sup>5</sup> and mechanical thrombectomy<sup>6</sup>, there are few biomarkers capable of predicting patients' functional outcomes<sup>7</sup>.

After stroke, the immune response induces chronic inflammation, which is one of the major causes of the progression of ischemic injury. Microglia are involved in chronic inflammation in the brain and have a myeloid origin<sup>8</sup>. These cells, considered the macrophages of the central nervous system (CNS), are almost immediately activated after the onset of brain ischemia and can produce proinflammatory mediators and neurotoxic compounds, which leads to the migration of leukocytes toward the injured brain<sup>8</sup>. The activated microglia are divided into classic (M1) or proinflammatory response and alternative (M2) or anti-inflammatory response activation phenotypes, and the polarization of the cells is dependent on the stage of the disease development<sup>9</sup>. Therefore, depending on the different signals received by microglial receptors, activated microglia function to either exacerbate ischemic injury or induce repair and regeneration<sup>8</sup>.

Triggering receptors expressed on myeloid cells (TREM proteins) are a family of cell surface receptors that participate in a variety of cellular processes, including

inflammation, coagulation, and neurological development, and are localized mainly on microglia<sup>10</sup>.

TREM-1 (triggering receptor expressed on myeloid cells type 1) acts by amplifying the inflammatory response. Activation of TREM-1 causes the release of proinflammatory cytokines, promotes neutrophil degranulation and increases phagocytosis, in addition to increasing the inflammatory response when there is an associated infectious process<sup>10, 11</sup>. Functional studies on TREM-1 have shown that this biomarker alone induces only modest cellular activation and proinflammatory cytokine secretion but acts synergistically with receptors involved in the innate immune response whose neurotoxic and/or neuroprotective effects are not yet fully understood, such as Toll-like receptors (TLRs) and Nod-like receptors (NLRs)<sup>10</sup>. The origin of TREM-1 has not yet been clearly elucidated but appears to be linked to the translation of mRNA, and it is expressed in neutrophils, monocytes/macrophages and some dendritic cells<sup>10, 12</sup>. Some genetic polymorphisms of TREM-1 are associated with atherosclerotic disease, as there is increased expression of TREM-1 in atheromatous inflammatory lesions compared to fibrous plaques, and in vitro studies have showed a synergistic effect between TREM-1 and dyslipidemia, but its value as a prognostic marker is still questionable<sup>11,13,14</sup>. However, studies have shown an increase in the plasma concentration of TREM-1 after acute myocardial infarction and a correlation of its level with worse prognosis (death and myocardial dysfunction)<sup>15</sup>. Studies in patients with subarachnoid hemorrhage also showed a correlation between elevated cerebrospinal fluid level of TREM-1 and the severity and prognosis of the disease as assessed by the Rankin scale during the first month after the event<sup>16, 17</sup>. Other research suggests that TREM-1 protein is involved in the migration of neutrophils through the epithelium and in the infiltration by macrophages into the pathological area as probable explanations for the amplifying effect of the inflammatory response<sup>18</sup>. Another potential function of TREM-1 observed in patients with antiphospholipid syndrome is its expression on the platelet surface after activation, contributing to platelet aggregation and thrombus formation<sup>19</sup>.

TREM-2 (triggering receptor expressed in myeloid cells type 2) is a microglial/macrophages receptor with some expression on the surface of the cell membrane but is transported mainly as an intracellular soluble protein through the ventricular walls and the choroid plexus to the cerebral parenchyma via radial glial cells<sup>10, 20</sup>. The TREM-2 protein plays a key role in inflammation, inducing the

expression of cytokine receptors, cell migration (dendritic cells and macrophages) and phagocytosis, but does not promote the release of inflammatory cytokines with anti-inflammatory function<sup>10, 20</sup>. The absence of TREM-2 expression in microglia reduces the phagocytic capacity and increases the production of proinflammatory cytokines<sup>20</sup>. In a postmortem study, TREM-2 cell expression was observed in the cerebral parenchyma of infarcted areas between the first and third days, suggesting the beginning of the phagocytic process of the necrotic tissue, since the cellular characteristics predominantly suggested the participation of probably recruited macrophages from the circulation in relation to microglia<sup>21</sup>. Microglia are the immune cells present in the parenchyma of the central nervous system and present a rapid response to changes in this microenvironment. They have the function of removing debris and maintaining homeostasis. As age increases, there appears to be a reduction in the expression of TREM-2, which affects neuronal survival, a hypothesis that was initially proposed based on experimental models of Alzheimer's disease<sup>20</sup>. In addition, genetic disorders in which TREM-2 deficiency has been identified also present early neurological deficit (dementia)<sup>10</sup>. In a postendarterectomy atherosclerotic carotid plaque study, increased TREM-1 and reduced TREM-2 expression were detected in symptomatic patients compared to asymptomatic patients<sup>22</sup>. Another recent experimental model study demonstrated that TREM-2 overexpression markedly suppressed the inflammatory response and neuronal apoptosis in cerebral ischemia/reperfusion injury<sup>8</sup>. Therefore, the TREM-2 protein appears to be important for neurogenesis and neuroplasticity<sup>20</sup>.

The variability of TREM protein expression and its role in cerebrovascular diseases particularly in ischemic stroke, has not yet been properly evaluated. The present study had the following objectives: (1) to determine whether the serum concentrations of TREM-1 and TREM-2 correlate with neurologic stroke severity and outcomes, as measured by the National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS) and the modified Rankin Scale (mRS) during the hospital stay, at hospital discharge and after four years; (2) to determine whether serial measurements of TREM-1 and TREM-2 are useful to predict outcomes and identify the best times to conduct the measurements; (3) to determine whether the serum concentrations of TREM-1 and TREM-2 correlate with favorable or unfavorable outcome; (4) to determine whether the serum levels of TREM-1 and TREM-2 correlate with hospital stay after stroke; and (5) to determine whether the serum concentrations of TREM-1 and TREM-2 correlate with

the ischemic area size (lacunar versus segmental), as evaluated by computed tomography.

## **Material and Methods**

### **Design, Patients and Setting**

Fifty consecutive patients with acute ischemic stroke within 24 hours of stroke onset admitted to the neurovascular emergency unit or intensive care unit at Hospital de Clínicas de Porto Alegre, a university public hospital located in the southern region of Brazil, were enrolled. This prospective observational study was approved by the National and Institutional Committee of Ethics (CAAE: 54829116.3.0000.5327 and CEP-HCPA: 18-0087). All participants or their legal designees provided written informed consent.

The inclusion criteria for the study were consecutive patients with acute stroke admitted within 24 hours after the onset of symptoms, above 18 years old. A CT scan was routinely performed before study inclusion to exclude patients with intracerebral hemorrhage. Exclusion criteria were patients with terminal cancer, prior definition of treatment limitations and chronic infectious diseases. Demographics, vascular risk factors, clinical characteristics and previous medication were recorded.

Neurological stroke severity and global disability were determined with the NIHSS within 24 hours of the acute event, on the third day after the stroke, on the fifth day after the stroke and at the time of hospital discharge. The mRS was applied at the same times and after four years. For outcome analysis, the hospital discharge outcome was dichotomized into favorable (NIHSS  $\leq$  6 and mRS  $\leq$  2) and unfavorable outcomes (NIHSS  $>$  6 and mRS  $>$  2). For the evaluation after four years the same mRS dichotomization was used. The same group of experienced neurologists and a neurointensivist performed all neurological examinations.

All patients provided venous blood samples for TREM-1 and TREM-2 measurements within 24 hours of the acute event, on the third day after the stroke, and on the fifth day. Twenty healthy volunteers with similar risk factors, without previous stroke or myocardial infarction, also provided a single blood sample for comparison of baseline biomarker values. The blood samples were drawn using tubes containing CAT Serum Separator Clot Activator or ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) and were immediately delivered to the laboratory. Plasma and serum were

quickly isolated from whole blood via centrifugation (4500 rpm for 10 min), and the samples were stored at -80°C for later analysis. The levels of TREM-1 and TREM-2 were determined with a sandwich-ELISA using a monoclonal antibody specific for each marker (TREM-1: Human TREM-1 ELISA, Abcam, AB100659; TREM-2: Human TREM-2 DuoSet ELISA, R&D Systems, DY1828-05) according to the manufacturers' instructions.

## **Statistical Analysis**

Quantitative data are summarized as mean and standard deviation. When distributional assumptions were in doubt, median and interquartile range (P25 to P75) are presented. Categorical data are presented as counts and percentages. Simple bivariate comparisons between groups were conducted using the rank sum test (Mann-Whitney test). Since the studied biomarkers did not follow a symmetric distribution, stroke patients and controls were compared during the observational period using generalized estimating equations with a logarithmic link function (gamma distribution) and an exchangeable covariance matrix to allow for clustered data. Additional between-group comparisons were carried out with appropriate post-hoc procedures. Correlations between quantitative variables were assessed using Spearman's rank correlation coefficient. The predictive ability of these biomarkers for good versus bad outcomes was evaluated using the area under the receiver operating characteristics (ROC) curve (AUC) followed by 95% confidence intervals. P values below 0.05 were deemed statistically significant. Data were analyzed with IBM-SPSS version 22.0.

## **Results**

Fifty patients (27 men, 23 women) with a mean age of 62 (SD±13) years with acute ischemic stroke were included. The median NIHSS score on admission was 7 (range 4–14), and the median NIHSS score at hospital discharge was 3 (range 1–8). Only 30% of the patients were treated with intravenous rt-PA due to the late arrival time at the hospital and the limited therapeutic window (4.5 hours until the time of inclusion). The median mRS score at hospital discharge was 1 (range 1–3) and after four years, it was 2 (range 1–6). The mortality rate was 28% (Table 1). The results

showed no significant difference between the mean values of biomarkers considering thrombolized and nonthrombolized patients.

There was a significant change in the serum level of TREM-1 between the measurements performed within 24 hours, on the third day and on the fifth day after stroke, with a higher level on the third day. The same was not observed for the TREM-2 measurements (Table 2). Serum levels of the same biomarkers were measured in 20 volunteers with the same risk factors without cerebrovascular events for comparison, and significantly lower values were observed ( $p < 0.01$ ) (Table 3, Figure 1).

Analyzing the correlation between these biomarkers and stroke scales at the three measures times, TREM-1, but not TREM-2, showed a correlation with NIHSS and mRS within 24 hours (NIHSS and TREM-1:  $r_s = 0.31$ ,  $p = 0.029$ ; mRS and TREM-1:  $r_s = 0.32$ ,  $p = 0.023$ ) (Table 4). In addition, the serum level of TREM-1 within 24 hours presented the best correlation with the neurological outcomes at hospital discharge (NIHSS and TREM-1:  $r_s = 0.34$ ,  $p = 0.021$ ; mRS and TREM-1:  $r_s = 0.27$ ,  $p = 0.049$ ) (Table 5).

For a further evaluation, the patients were subdivided into two groups according to the NIHSS score (NIHSS  $\leq 6$  and NIHSS  $> 6$ ) and according to the mRS score (mRS  $\leq 2$  and mRS  $> 2$ ), which were employed as neurological outcome measures. Both neurologic scores for favorable outcome (NIHSS  $\leq 6$  and mRS  $\leq 2$ ) at hospital discharge, which were correlated with TREM-1 protein level within 24 hours, had low predictive value, as expressed using the area under the ROC curve (NIHSS  $\leq 6$  and TREM-1: AUC=0.64; mRS  $\leq 2$  and TREM-1: AUC=0.67). The other measurements did not present any predictive capacity in the short or long periods of observation (Table 6). The serum concentrations of TREM-1 protein within 24 hours after stroke was significantly higher in patients with poor outcome (mRS  $> 2$ ) at hospital discharge ( $p = 0.021$ ) (Tables 7 and 8, Figures 2 and 3). However, there was no correlation between TREM-1 or TREM-2 with the neurological outcomes after four years (Table 9, Figure 4).

The length of hospital stay did not significantly correlate with TREM-1 or TREM-2 concentration (Table 10). Moreover, the serum concentrations of these biomarkers did not significantly differ at any of the time points after diagnosis between lacunar and segmental stroke ( $p > 0.05$ ) (Table 11).



## Discussion

Biomarkers are currently used in stroke<sup>4</sup>. The best-validated clinical prognostic scales are probably not accurate enough to predict outcome in individual patients with ischemic stroke, and the identification of blood biomarkers may aid in understanding the pathophysiology and prediction of outcomes<sup>2, 3</sup>. However, the clinical significance of most blood markers remains uncertain<sup>3</sup>.

The inflammatory process following an ischemic stroke occurs in three different phases of increasing lengths of time: initiation (hours), propagation (days), and resolution (days to weeks). A distinct pattern of immune cell response and extracellular signaling molecules is associated with each phase<sup>23</sup>. Cerebral ischemia causes the release of highly immunogenic cellular components, or damage-associated molecular patterns (DAMPs), from the brain into the systemic circulation and after the rupture of the integrity of the blood-brain barrier (BBB). These DAMPs activate and recruit peripheral innate and adaptive immune cells to ischemic brain regions<sup>24</sup>.

Microglia are the resident immune cells of the CNS that patrol and act as sentinels of the brain<sup>23</sup>. Recent data point to the importance of interactions between neurons and microglia, which that include several potential messengers, including cytokines, purines, prostaglandins, reactive oxygen species and nitric oxide, which are relevant determinants of neuronal death in cerebral ischemia<sup>8,9</sup>.

TREM proteins are mainly expressed by microglia in the CNS. TREM-1 is an amplifier of the inflammatory response; however, TREM-2 inhibits the inflammatory response and is highly involved in phagocytic activity<sup>9, 25</sup>. During the propagation phase of inflammation in ischemic stroke, aspects of the proinflammatory (M1) and anti-inflammatory (M2) transition in microglia versus infiltrating macrophages are unsettled<sup>23</sup>.

In our study we found significantly elevated blood levels of TREM-1 and TREM-2 in acute ischemic stroke patients compared with healthy volunteers with the same risk factors, suggesting that they are associated with a neuroinflammatory state and microglial activation after the ischemic event. Several human and experimental studies corroborate these findings<sup>8, 9, 21, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29</sup>.

The significant change in the serum level of TREM-1 between the measurements performed within 24 hours, on the third day and on the fifth day, with higher levels on the third day and, together with the absence of significant variations

in the serum level of TREM-2 at the same measurement times, can be explained by the fact that the serum level of TREM-1 increases soon after ischemic injury, while the peak of TREM-2 occurs around the seventh day after stroke as shown principally in experimental models<sup>24, 25, 28</sup>.

This study also found a significant correlation between the blood level of TREM-1 within 24 hours and at hospital discharge and the stroke scales scores. Despite the serum peak of TREM-1 on the third day after stroke, the early measurements support the clinical findings in the first hours and at hospital discharge. Current evidence suggests that the initial proinflammatory response in the penumbral area near the infarcted (dead) core and the sequential serum increase in the biomarkers involved in this process correlate with the clinical manifestations<sup>22, 23</sup>.

Considering the use of biomarkers of the TREM family in the evaluation of patients' prognosis after ischemic stroke with the patients subdivided into two groups, favorable outcome (NIHSS  $\leq 6$  and mRS  $\leq 2$ ) and poor outcome (NIHSS  $> 6$  and mRS  $> 2$ ), only the TREM-1 level within 24 hours presented predictive capacity at hospital discharge in this study, though this capacity was low. However, the significant increase in TREM-1 level in the first 24 hours was associated with an unfavorable outcome as assessed by the modified Rankin scale (mRS  $> 2$ ) at hospital discharge. During this period, the patients included in the study had no infection. Again, these results emphasize the early elevation in serum TREM-1 and its correlation with unfavorable neurological outcomes, probably due to the amount of the inflammatory response<sup>15, 16, 17, 24</sup>. Studies in patients with sepsis and septic shock have shown similar results, presenting a significant correlation with validated scoring systems and prognostic value<sup>30, 31</sup>. These results are new, at least as far as we know, as there are no clinical studies analyzing blood TREM protein markers in patients with acute ischemic stroke and for short-term and long-term prognosis.

Regarding the size/type of stroke (lacunar or segmental), our results do not show a significant correlation with the serum levels of the selected biomarkers. Experimental studies have shown a significant correlation between a reduced level of TREM-2 and larger infarct size<sup>25, 29</sup>. The reason for this discrepancy remains unclear. Some possible explanations for these findings may be related to the time of ischemia, the partial reperfusion area of the penumbra and the type of phagocytic activity. A prior report suggested that activated microglia and hematogenous macrophages are involved in infarct development after cerebral ischemia, but the majority of phagocytes

in the infarct area are derived from local microglia, preceding and predominating over phagocytes of hematogenous origin. This recruitment reveals a strong predominance of local defense mechanisms for tissue clearance over immune cells arriving from the blood after ischemic damage, and this may influence the serum measurement of TREM-2<sup>26, 32, 33</sup>. Some studies suggest that the local (cerebrospinal fluid) measurement of the biomarkers may present better prognostic capacity compared to serum levels<sup>34</sup>.

We did not observe a significant correlation between length of hospital stay and TREM-1 or TREM-2. This may be because ischemic stroke is a complex condition, and there is a large degree of heterogeneity between patients' biochemical profiles, which are likely to be altered by the site, intensity, and duration of ischemia and other inflammatory and infectious complications during hospital stay<sup>2, 25</sup>. Infections represent one of the most frequent complications after acute stroke with an estimated prevalence of 30%<sup>35</sup>. Despite the increase in the incidence of infections with length of hospital stay and the fact that several studies show an increase in the serum level of TREM-1 in septic patients due to the upregulation and sustained increase in TREM-1 when the host immune system is exposed to infectious invaders<sup>30, 35</sup>, we did not observe an increase in the level of TREM-1 after the third day, a finding that could be related to this complication.

Some limitations of this research should be considered. The present study included a variety of stroke subtypes in terms of TOAST classification (Trial of ORG 10172 in Acute Stroke Treatment), infarct size, location and treatments for acute stroke patients, making a detailed analysis difficult. Because patients with infections were not excluded from the study, infection may be responsible for part of the observed association between inflammatory markers and outcomes. Patients taking anti-inflammatory medications were also not excluded, which may have altered the mechanism of inflammation due to ischemic stroke. We used stroke scales to estimate stroke severity and patient outcomes, but these scores do not capture all stroke-related impairments. We selected only 2 blood biomarkers involved in the pathophysiology of stroke to verify their association with outcomes after stroke. We did not evaluate the differences between their local and serum concentrations or the genetic variants that may be involved in the inflammatory response. Therefore, the present results need confirmation in further larger studies with a larger number of patients.

## Conclusion

Blood biomarkers may be useful in acute stroke by suggesting stroke severity, correlating with clinical findings, or providing prognostic value. In this study, TREM-1 was found to be the best prognostic biomarker. The addition of the TREM-1 level to previously validated stroke scales slightly improves the ability of these scales to predict short-term outcome, though it had no prognostic value for the long term. According to our study, the accuracy with which the TREM family biomarkers predict outcome after acute stroke is perhaps too low to be clinically useful by themselves. Thus, this topic requires further study to identify an ideal biomarker or a panel of biomarkers for acute stroke that has clinical prognostic relevance and potential to improve the bedside management of these patients.

## Conflict of interest

There is no conflict of interest.

## References

1. Benjamin EJ, Muntner P, Alonso A, Bittencourt MS, Callaway CW, Carson AP, et al; American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart Disease and Stroke Statistics-2019 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2019 Mar; 139(10): e56-e528.
2. Hasan N, McColgan P, Bentley P, Edwards RJ, Sharma P. Towards the identification of blood biomarkers for acute stroke in humans: a comprehensive systematic review. *Br J Clin Pharmacol*. 2012 Aug; 74(2): 230-240.
3. Whiteley W, Chong WL, Sengupta A, Sandercock P. Blood markers for the prognosis of ischemic stroke: a systematic review. *Stroke*. 2009 May; 40(5): e380-389.
4. Jickling GC, Sharp FR. Biomarker panels in ischemic stroke. *Stroke*. 2015 Mar; 46(3):915-20.
5. Ma H, Campbell BCV, Parsons MW, Churilov L, Levi CR, Hsu C, et al. Thrombolysis Guided by Perfusion Imaging up to 9 Hours after Onset of Stroke. *N Engl J Med*. 2019 May; 380(19): 1795-1803.

6. Tate WJ, Polding LC, Kemp S, Mlynash M, Heit JJ, Marks MP, et al. Thrombectomy Results in Reduced Hospital Stay, More Home-Time, and More Favorable Living Situations in DEFUSE 3. *Stroke*. 2019 Jul 10: STROKEAHA119025165 doi: 10.1161/STROKEAHA.119.025165 [Epub ahead of print].
7. Raman K, Paré G. Of stroke and biomarkers: the elusive quest for a clinical biomarker panel. *Clin Biochem*. 2013 Jun; 46(9): 705-706.
8. Wu R, Li X, Xu P, Huang L, Cheng J, Huang X, et al. TREM2 protects against cerebral ischemia/reperfusion injury. *Mol Brain*. 2017 Jun; 10(1): 20-32.
9. Zhao SC, Ma LS, Chu ZH, Xu H, Wu WQ, Liu F. Regulation of microglial activation in stroke. *Acta Pharmacol Sin*. 2017 Apr; 38(4): 445-458.
10. Klesney-Tait J, Turnbull IR, Colonna M. The TREM receptor family and signal integration. *Nat Immunol*. 2006 Dec; 7(12): 1266-1273.
11. Golovkin AS, Ponasenko AV, Khutornaya MV, Kutikhin AG, Salakhov RR, Yuzhalin AE, et al. Association of TLR and TREM-1 gene polymorphisms with risk of coronary artery disease in a Russian population. *Gene*. 2014 Oct; 550(1): 101-109.
12. Joffre J, Ait-Oufella H. Targeting the immune response in atherosclerosis: It's time for clinical trials! *Arch Cardiovasc Dis*. 2017 Dec; 110(12): 643-645.
13. Zysset D, Weber B, Rihs S, Brasseit J, Freigang S, Riether C, et al. TREM-1 links dyslipidemia to inflammation and lipid deposition in atherosclerosis. *Nat Commun*. 2016 Oct; 7: 13151-13166.
14. Solanki A, Bhatt LK, Johnston TP. Evolving targets for the treatment of atherosclerosis. *Pharmacol Ther*. 2018 Jul; 187: 1-12.
15. Jérémie L, Amir B, Marc D, Sébastien G. The Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells-1: A new player during acute myocardial infarction. *Pharmacol Res*. 2015 Oct; 100: 261-265.
16. Sun XG, Ma Q, Jing G, Wang GQ, Hao XD, Wang L. Increased levels of soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in cerebrospinal fluid of subarachnoid hemorrhage patients. *J Clin Neurosci*. 2017 Jan; 35: 139-143.
17. Sun XG, Ma Q, Jing G, Wang L, Hao XD, Wang GQ. Early elevated levels of soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in subarachnoid hemorrhage patients. *Neurol Sci*. 2017 May; 38(5): 873-877.
18. Maione F, Iqbal AJ, Raucci F, Letek M, Bauer M, D'Acquisto F. Repetitive Exposure of IL-17 Into the Murine Air Pouch Favors the Recruitment of Inflammatory Monocytes and the Release of IL-16 and TREM-1 in the Inflammatory Fluids. *Front Immunol*. 2018 Nov; 9: 2752-2764.

19. Edel Y, Kliminski V, Pokroy-Shapira E, Oren S, Dortort Lazar A, Pri-Paz Basson Y, et al. Elevated plasma level of soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 is associated with inflammation activity and is a potential biomarker of thrombosis in primary antiphospholipid syndrome. *Arthritis Res Ther.* 2019 Jan; 21(1): 10-19.
20. Raha AA, Henderson JW, Stott SR, Vuono R, Foscarin S, Friedland RP, et al. Neuroprotective Effect of TREM-2 in Aging and Alzheimer's Disease Model. *J Alzheimers Dis.* 2017; 55(1): 199-217.
21. Fahrenhold M, Rakic S, Classey J, Brayne C, Ince PG, Nicoll JAR, et al. TREM2 expression in the human brain: a marker of monocyte recruitment? *Brain Pathol.* 2018 Sep; 28(5): 595-602.
22. Rai V, Rao VH, Shao Z, Agrawal DK. Dendritic Cells Expressing Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-1 Correlate with Plaque Stability in Symptomatic and Asymptomatic Patients with Carotid Stenosis. *PLoS One.* 2016 May; 11(5): e0154802.
23. Shekhar S, Cunningham MW, Pabbidi MR, Wang S, Booz GW, Fan F. Targeting vascular inflammation in ischemic stroke: Recent developments on novel immunomodulatory approaches. *Eur J Pharmacol.* 2018 Aug; 833: 531-544.
24. Liu Q, Johnson EM, Lam RK, Wang Q, Bo Ye H, Wilson EN, et al. Peripheral TREM1 responses to brain and intestinal immunogens amplify stroke severity. *Nat Immunol.* 2019 Jul 1. doi: 10.1038/s41590-019-0421-2. [Epub ahead of print].
25. Kawabori M, Kacimi R, Kauppinen T, Calosing C, Kim JY, Hsieh CL, et al. Triggering receptor expressed on myeloid cells 2 (TREM2) deficiency attenuates phagocytic activities of microglia and exacerbates ischemic damage in experimental stroke. *J Neurosci.* 2015 Feb; 35(8): 3384-3396.
26. Wang Q, Tang XN, Yenari MA. The inflammatory response in stroke. *J Neuroimmunol.* 2007 Mar; 184(1-2): 53-68.
27. Hu X, Li P, Guo Y, Wang H, Leak RK, Chen S, et al. Microglia/macrophage polarization dynamics reveal novel mechanism of injury expansion after focal cerebral ischemia. *Stroke.* 2012 Nov; 43(11): 3063-3070.
28. Sieber MW, Jaenisch N, Brehm M, Guenther M, Linnartz-Gerlach B, Neumann H, et al. Attenuated inflammatory response in triggering receptor expressed on myeloid cells 2 (TREM2) knock-out mice following stroke. *PLoS One.* 2013 Jan; 8(1): e52982.
29. Kurisu K, Zheng Z, Kim JY, Shi J, Kanoke A, Liu J, et al. Triggering receptor expressed on myeloid cells-2 expression in the brain is required for maximal phagocytic activity and improved neurological outcomes following experimental stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2018 Dec: 271678X18817282. doi: 10.1177/0271678X18817282. [Epub ahead of print].

30. Charles PE, Noel R, Massin F, Guy J, Bollaert PE, Quenot JP, et al. Significance of soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 elevation in patients admitted to the intensive care unit with sepsis. *BMC Infect Dis.* 2016 Oct; 16(1): 559-570.
31. Jedynak M, Siemiatkowski A, Mroczko B, Groblewska M, Milewski R, Szmitkowski M. Soluble TREM-1 Serum Level can Early Predict Mortality of Patients with Sepsis, Severe Sepsis and Septic Shock. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2018 Aug; 66(4): 299-306.
32. Schilling M, Besselmann M, Müller M, Strecker JK, Ringelstein EB, Kiefer R. Predominant phagocytic activity of resident microglia over hematogenous macrophages following transient focal cerebral ischemia: an investigation using green fluorescent protein transgenic bone marrow chimeric mice. *Exp Neurol.* 2005 Dec; 196(2): 290-297.
33. Gervois P, Lambrichts I. The Emerging Role of Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 2 as a Target for Immunomodulation in Ischemic Stroke. *Front Immunol.* 2019 Jul; 10: 1668-1675.
34. Sandquist M, Wong HR. Biomarkers of sepsis and their potential value in diagnosis, prognosis and treatment. *Expert Rev Clin Immunol.* 2014 Oct; 10(10): 1349-1356.
35. Bustamante A, García-Berrocso T, Penalba A, Giralt D, Simats A, Muchada M, et al. Sepsis biomarkers reprofiling to predict stroke-associated infections. *Neuroimmunol.* 2017 Nov; 312: 19-23.

**Table 1 - Baseline characteristics of the study population.**

Characteristics	n=50
Age, years	62±13
Gender, n° (%)	
Male	27 (54)
Female	23 (46)
Ethnic, n° (%)	
White	40 (80)
Black	2 (4)
Miscellanea	8 (16)
Thrombolysis, n° (%)	15 (30)
Type of stroke, n° (%)	
Lacunar	30 (60)
Segmental	20 (40)
Length of stay (days)	10.5 (6.0–16.3)
NIHSS at admission	7 (4–14)
NIHSS at hospital discharge¶	3 (1–8)
mRS at admission	3 (2–4)
mRS at hospital discharge	1 (1–3)
mRS after four years	2 (1–6)
Mortality during hospitalization, n° (%)	4 (8)
Mortality after four years, n° (%)¶	14 (28)

Data are described as mean±standard deviation, counts (percentages) or median (interquartile range: P25 to P75). Abbreviations: NIHSS, National Institutes of Health Stroke Scale; mRS, modified Rankin scale. ¶ n=46.



**Table 2 - Blood biomarkers according to time points of observation, n=50.**

<b>Biomarker</b>	<b>Within 24 hours</b>	<b>Third day</b>	<b>Fifth day¶</b>	<b>p</b>
TREM-1	68.10 <sup>a</sup> (57.39–80.81)	136.62 <sup>b</sup> (116.52–160.18)	47.46 <sup>c</sup> (38.64–58.29)	<b>&lt;0.001</b>
TREM-2	445.26 (304.68–650.68)	389.17 (256.74–589.89)	479.47 (303.70–756.99)	0.306

Data are described as mean and 95% confidence interval (in parentheses). Statistical significance was tested using generalized estimating equations with a log link function (gamma). Different index-letters represent statistically significant differences at post-hoc comparisons.

Abbreviations: TREM-1, triggering receptor expressed on myeloid cells 1; TREM-2, triggering receptor expressed on myeloid cells 2. ¶ n=46.

**Table 3 - Comparison of serum biomarker values between ischemic stroke patients (cases) and controls.**

<b>Biomarker</b>	<b>Cases (n=50)</b>	<b>Controls (n=20)</b>	<b>p</b>
TREM-1 within 24 hours	68.10 (56.77–81.69)	30.01 (22.51–40.02)	<b>&lt;0.001</b>
TREM-1 on the third day	136.62 (115.44–161.68)	30.01 (23.00–39.17)	<b>&lt;0.001</b>
TREM-1 on the fifth day	47.83¶ (39.36–58.12)	30.01 (22.33–40.34)	<b>&lt;0.010</b>
TREM-2 within 24 hours	445.26 (341.04–581.32)	88.02 (57.74–134.19)	<b>&lt;0.001</b>
TREM-2 on the third day	389.17 (291.24–520.03)	88.02 (55.66–139.20)	<b>&lt;0.001</b>
TREM-2 on the fifth day	432.86¶ (311.29–601.90)	88.02 (53.68–144.34)	<b>&lt;0.001</b>

Data are described as mean and 95% confidence interval (in parentheses). Statistical significance was tested using generalized estimating equations with a log link function (gamma).

Abbreviations: TREM-1, triggering receptor expressed on myeloid cells 1; TREM-2, triggering receptor expressed on myeloid cells 2. ¶ n=46.

**Table 4 - Correlations between biomarkers and stroke scales NIHSS and mRS, n=50.**

Biomarker	Within 24 hours		Third day		Fifth day¶	
	NIHSS	mRS	NIHSS	mRS	NIHSS	mRS
TREM-1	0.31 (0.029)	0.32 (0.023)	0.13 (0.362)	0.08 (0.556)	-0.05 (0.717)	-0.14 (0.359)
TREM-2	-0.11 (0.462)	-0.07 (0.617)	-0.09 (0.522)	-0.09 (0.516)	-0.23 (0.129)	-0.27 (0.078)

Data represent Spearman's rank correlation coefficient ( $p$  value).

Abbreviations: NIHSS, National Institutes of Health Stroke Scale; mRS, modified Rankin scale;

TREM-1, triggering receptor expressed on myeloid cells 1; TREM-2, triggering receptor expressed on myeloid cells 2. ¶ n=46.

**Table 5 - Correlation matrix between biomarkers and stroke scales NIHSS and mRS at discharge and after four years, n=50.**

Biomarker	NIHSS at discharge	mRS at discharge	mRS after four years
TREM-1 within 24 hours	0.34 (0.021)	0.27 (0.049)	0.08 (0.590)
TREM-1 on the third day	0.11 (0.468)	0.03 (0.807)	-0.04 (0.772)
TREM-1 on the fifth day¶	-0.10 (0.515)	-0.17 (0.250)	0.04 (0.805)
TREM-2 within 24 hours	-0.06 (0.691)	-0.12 (0.387)	0.13 (0.382)
TREM-2 on the third day	-0.15 (0.312)	-0.27 (0.054)	-0.18 (0.226)
TREM-2 on the fifth day¶	-0.24 (0.122)	-0.30 (0.046)	-0.11 (0.475)

Data are presented as Spearman's rank correlation coefficient ( $p$  value).

Abbreviations: NIHSS, National Institutes of Health Stroke Scale; mRS, modified Rankin scale;

TREM-1, triggering receptor expressed on myeloid cells 1; TREM-2, triggering receptor expressed on myeloid cells 2. ¶ n=46.

**Table 6** - Values for area under the ROC curve of serum biomarkers for predicting good outcome of stroke scales NIHSS and mRS at discharge and after four years, n=50.

Biomarker	mRS ≤ 2 at discharge	NIHSS ≤ 6 at discharge	mRS ≤ 2 after four years
TREM-1 within 24 hours	0.67 (0.50–0.83)	0.64 (0.56–0.83)	0.56 (0.38–0.74)
TREM-1 on the third day	0.56 (0.39–0.73)	0.52 (0.38–0.72)	0.44 (0.26–0.62)
TREM-1 on the fifth day¶	0.44 (0.26–0.61)	0.51 (0.32–0.70)	0.55 (0.37–0.73)
TREM-2 within 24 hours	0.38 (0.21–0.54)	0.45 (0.25–0.65)	0.47 (0.29–0.65)
TREM-2 on the third day	0.32 (0.15–0.48)	0.35 (0.14–0.56)	0.37 (0.19–0.56)
TREM-2 on the fifth day¶	0.35 (0.18–0.52)	0.37 (0.17–0.56)	0.42 (0.24–0.60)

Data are presented as area under the ROC (*Receiver Operating Characteristics*) curve with the 95% confidence interval (in parentheses). Abbreviations: NIHSS, National Institutes of Health Stroke Scale; mRS, modified Rankin scale; TREM-1, triggering receptor expressed on myeloid cells 1; TREM-2, triggering receptor expressed on myeloid cells 2. ¶ n=46.

**Table 7** - Comparison of serum biomarker values between patients with mRS ≤ 2 vs mRS > 2 at discharge.

Biomarker	mRS ≤ 2 (n=30)	mRS > 2 (n=20)	p
TREM-1 within 24 hours	56.69 (46.22–69.52)	85.22 (66.36–109.44)	0.021
TREM-1 on the third day	131.92 (105.89–164.35)	143.66 (114.71–179.92)	0.596
TREM-1 on the fifth day	50.01¶ (38.42–65.08)	43.79¥ (31.65–60.58)	0.529
TREM-2 within 24 hours	552.88 (341.30–895.63)	283.81 (199.70–403.36)	0.064
TREM-2 on the third day	459.14 (284.76–740.31)	284.21 (127.42–633.94)	0.279
TREM-2 on the fifth day	596.96¶ (346.51–1028.44)	319.05¥ (142.68–713.39)	0.188

Data are described as mean and 95% confidence interval (in parentheses). Statistical significance was tested using generalized estimating equations with a log link function (gamma). Abbreviations: mRS, modified Rankin scale; TREM-1, triggering receptor expressed on myeloid cells 1; TREM-2, triggering receptor expressed on myeloid cells 2. ¶ n=27, ¥ n=19.

**Table 8-** Comparison of serum biomarker values between patients with NIHSS  $\leq 6$  vs NIHSS  $> 6$  at discharge.

Biomarker	NIHSS $\leq 6$ (n=34)	NIHSS $> 6$ (n=13)	<i>p</i>
TREM-1 within 24 hours	62.28 (49.95–77.67)	85.03 (65.19–110.91)	0.092
TREM-1 on the third day	137.79 (112.38–168.94)	139.32 (106.93–181.52)	0.948
TREM-1 on the fifth day	48.41¶ (37.41–62.63)	50.01 (34.87–71.74)	0.886
TREM-2 within 24 hours	486.46 (302.46–782.40)	388.07 (218.22–690.13)	0.549
TREM-2 on the third day	394.96 (247.90–629.26)	438.50 (181.28–1060.71)	0.842
TREM-2 on the fifth day	443.83¶ (295.59–666.42)	617.69 (222.44–1715.24)	0.604

Data are described as mean and 95% confidence interval (in parentheses). Statistical significance was tested using generalized estimating equations with a log link function (gamma). Abbreviations: NIHSS, National Institutes of Health Stroke Scale; TREM-1, triggering receptor expressed on myeloid cells 1; TREM-2, triggering receptor expressed on myeloid cells 2. ¶ n=30.

**Table 9 -** Comparison of serum biomarker values between patients with mRS  $\leq 2$  vs mRS  $> 2$  after four years.

Biomarker	mRS $\leq 2$ (n=24)	mRS $> 2$ (n=22)	<i>p</i>
TREM-1 within 24 hours	63.00 (49.57–80.07)	75.51 (58.14–98.08)	0.324
TREM-1 on the third day	145.97 (116.89–182.30)	131.72 (103.17–168.16)	0.541
TREM-1 on the fifth day	46.57¶ (32.83–66.07)	46.58¥ (35.21–61.64)	0.999
TREM-2 within 24 hours	391.25 (252.75–605.64)	517.82 (274.06–978.41)	0.504
TREM-2 on the third day	428.27 (236.63–775.12)	366.48 (191.08–702.87)	0.728
TREM-2 on the fifth day	441.14¶ (264.06–736.97)	571.27¥ (272.35–1198.24)	0.595

Data are described as mean and 95% confidence interval (in parentheses). Statistical significance was tested using generalized estimating equations with a log link function (gamma). Abbreviations: mRS, modified Rankin scale; TREM-1, triggering receptor expressed on myeloid cells 1; TREM-2, triggering receptor expressed on myeloid cells 2. ¶ n=22, ¥ n=20.

**Table 10 - Correlations between biomarkers and the length of the hospital stay, n=50.**

Biomarker	Length of stay
TREM-1 within 24 hours	0.14 (0.326)
TREM-1 on the third day	0.05 (0.747)
TREM-1 on the fifth day¶	0.19 (0.203)
TREM-2 within 24 hours	-0.01 (0.945)
TREM-2 on the third day	-0.03 (0.825)
TREM-2 on the fifth day¶	-0.21 (0.156)

Data represent Spearman's rank correlation coefficient (*p* value). Abbreviations: TREM-1, triggering receptor expressed on myeloid cells 1; TREM-2, triggering receptor expressed on myeloid cells 2. ¶ n=46.

**Table 11 - Comparison of serum biomarker values considering stroke size (lacunar vs segmental), n=50.**

Biomarker	lacunar	segmental	<i>p</i>
TREM-1 within 24 hours	61.05 (32.42–83.10)	72.62 (39.08–94.91)	0.289
TREM-1 on the third day	131.04 (75.87–180.35)	123.31 (68.75–158.92)	0.458
TREM-1 on the fifth day¶	41.45 (29.03–76.41)	33.77 (19.37–61.31)	0.184
TREM-2 within 24 hours	234.83 (107.76–527.94)	312.42 (125.08–525.95)	0.766
TREM-2 on the third day	195.82 (105.45–414.18)	187.59 (112.36–382.53)	0.874
TREM-2 on the fifth day¶	274.34 (133.77–429.35)	141.18 (73.27–327.42)	0.141

Data are described as median and interquartile range (P25 to P75). Abbreviations: TREM-1, triggering receptor expressed on myeloid cells 1; TREM-2, triggering receptor expressed on myeloid cells 2. ¶ n=46.

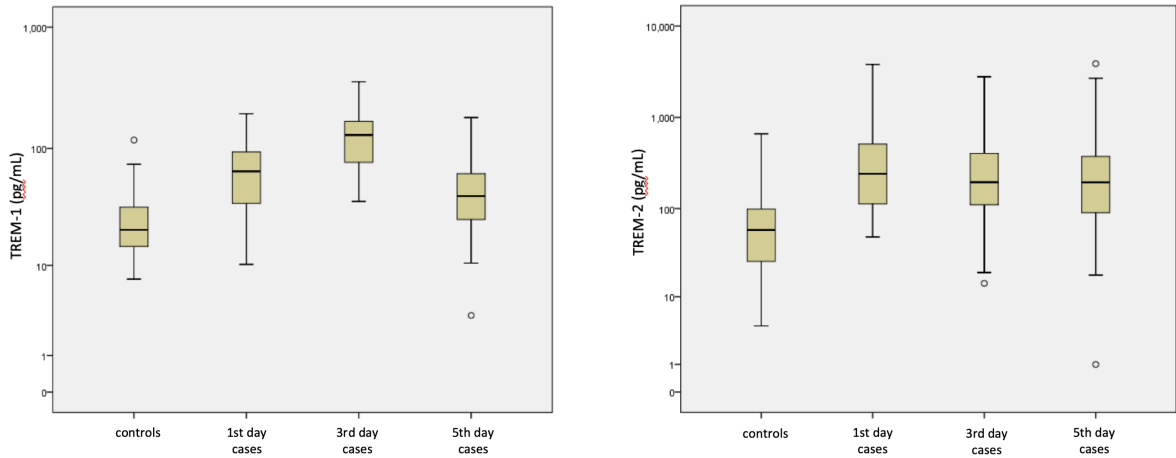


Figure 1: Comparison of serum biomarker values between patients with ischemic stroke (cases) and controls.

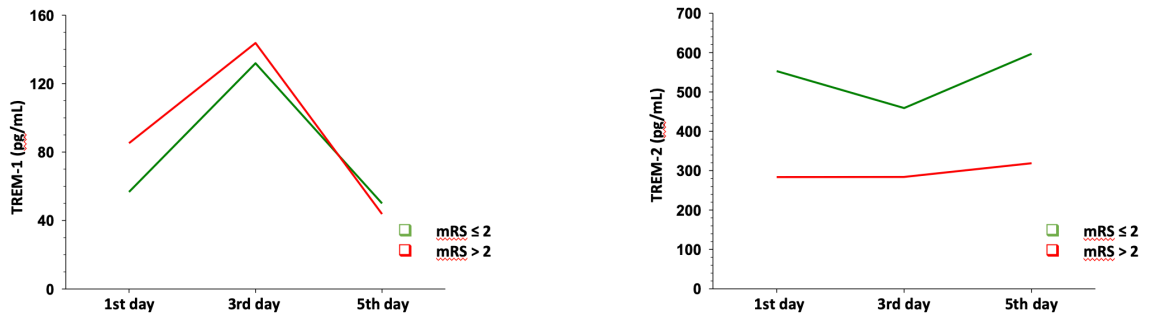


Figure 2: Comparison of serum biomarker values between patients with  $mRS \leq 2$  vs  $mRS > 2$  at hospital discharge.

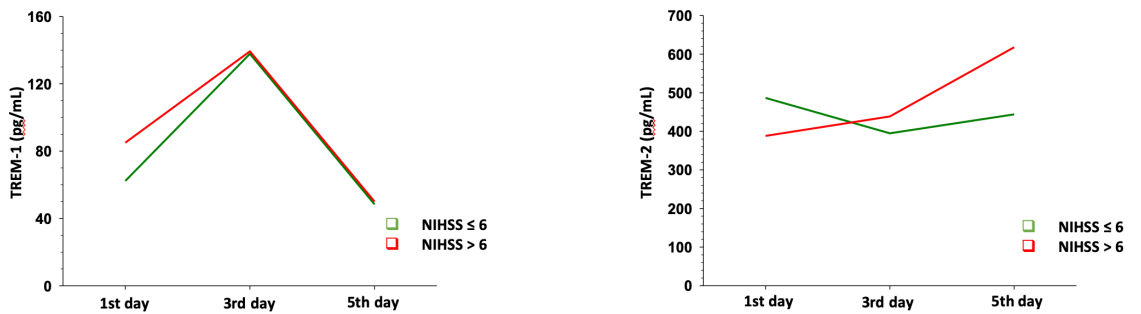


Figure 3: Comparison of serum biomarker values between patients with  $NIHSS \leq 6$  vs  $NIHSS > 6$  at hospital discharge.

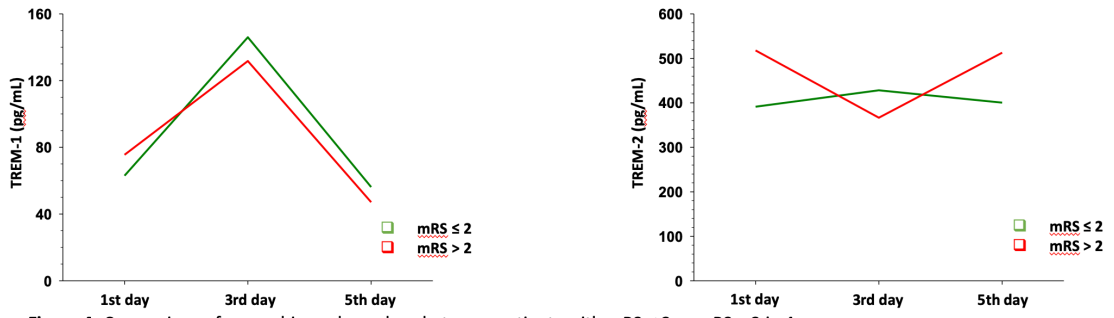


Figure 4: Comparison of serum biomarker values between patients with  $mRS \leq 2$  vs  $mRS > 2$  in 4 years.

## 8. ARTIGO 2

### **IL-23 and IL-17 in Acute Ischemic Stroke: Correlation with Stroke Scales and Prognostic Value**

Authors: Backes FN<sup>1</sup>, Souza A<sup>2</sup>, Bianchin MM<sup>3</sup>

<sup>1</sup> PhD candidate at Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) and intensivist at the Intensive Care Unit of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Rua Ramiro Barcelos 2350, CEP 90035-903, Porto Alegre, RS, Brazil, Tel.: +55-51-21018000. Email: fabianebackes@gmail.com

<sup>2</sup> Professor at School of Pharmacy of Centro Universitário Unilasalle, Rua Victor Barreto 2288, CEP 92010-903, Canoas, RS, Brazil, Tel.: +55-51-81975718. Email: andressasz@gmail.com

<sup>3</sup> Professor at School of Medicine of Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) and Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Rua Ramiro Barcelos 2350, CEP 90035-903, Porto Alegre, RS, Brazil, Tel.: +55-51-21018000. Email: mmbianchin@hotmail.com



## Abstract

**Background and Purpose:** Ischemic stroke causes a broad spectrum of motor, sensory and cognitive impairments. There is an urgent need for accurate outcome prediction after acute ischemic stroke for physicians, patients, and their families to aid in early and informed decision-making about therapies, palliative care, or rehabilitation. In clinical practice, the prognosis is based on well-validated stroke scales, but they have limitations, and blood biomarkers measurements may improve the predictive capability. Inflammation plays a crucial role in brain damage following stroke with different local and peripheral activation pathways involved in post-ischemic neurodegeneration and neuroprotection mechanisms. For this study, we selected two important interleukins involved in the post-ischemic inflammatory process: interleukin 23 (IL-23) and interleukin 17 (IL-17).

**Material and Methods:** Fifty consecutive patients with acute ischemic stroke admitted to the neurovascular emergency unit or intensive care unit at Hospital de Clínicas de Porto Alegre within 24 hours of stroke onset were enrolled. All patients provided venous blood samples for IL-23 and IL-17 measurements within 24 hours of the acute event and on the third and fifth day after the stroke. Neurological stroke severity and global disability were determined with the National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS) within 24 hours of the acute event, on the third and fifth day after the stroke, and at the time of hospital discharge. The modified Rankin Scale (mRS) was applied at the same times and after four years. For short-term and long-term neurological outcome analysis, the patients were subdivided into two groups: favorable (NIHSS  $\leq$  6 and mRS  $\leq$  2) and poor outcome (NIHSS  $>$  6 and mRS  $>$  2).

**Results:** Both neurological scores for a favorable outcome at hospital discharge that were related to IL-23 protein within 24 hours and on the fifth day had a low predictive value. The other measurements did not show predictive capacity during the hospital observation time or after four years. There was a significant increase in median serum concentrations of IL-23 on the fifth day ( $p < 0.001$ ) and in IL-17 median levels on the third day compared to the first 24 hours after the acute injury ( $p < 0.001$ ). However, there was no correlation between IL-23 and IL-17 levels with the dichotomization of neurological outcomes at hospital discharge and after four years.

**Conclusion:** Neither IL-23 nor IL-17 had sufficient predictive power to be of clinical use to predict outcome after stroke. Thus, the research for better biomarkers with

clinical prognostic relevance and the potential to improve the bedside management of stroke patients needs to be continued.

**Keywords:** cerebral ischemic stroke, blood biomarkers, outcome, interleukin 23 (IL-23), interleukin 17 (IL-17).

## Introduction

Ischemic stroke is a leading cause of death and disability, resulting in a broad spectrum of motor, sensory, and cognitive impairments. It causes suffering for the patients and their families, loss of productivity, and high financial costs for the patients and the healthcare system<sup>1</sup>.

Patients' management with ischemic cerebrovascular disease is multifaceted and the priorities change during an individual patient's illness. The early treatment of acute ischemic stroke to improve a patient's outcome, including intravenous techniques, is limited by a narrow therapeutic window (recently extended to nine hours in patients who have hypoperfused but salvageable brain tissue detected on automated perfusion images) and mechanical thrombectomy<sup>2, 3</sup>. However, there is an urgent need for accurate prediction of outcome after acute ischemic stroke for physicians, patients, and their families to aid early and informed decision-making about therapies, palliative care or rehabilitation. In clinical practice, prognostication is based on well-validated stroke scales, such as the National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS) or the modified Rankin Scale (mRS), but they are imperfect<sup>4</sup>. Blood biomarker measurements may improve the predictive accuracy after stroke<sup>5, 6</sup>.

Ischemic stroke is caused by a deficiency of blood and oxygen by three main mechanisms: thrombosis, embolism, and decreased systemic perfusion<sup>7</sup>. Cerebral brain injury evokes a massive upregulation of the inflammatory response. Brain inflammation starts in the necrotic brain tissue (dying core) with the release of damage signals recognized by microglia. These resident immune cells activate the immune system's response together with peripheral leukocytes, which infiltrate the brain from the circulation within a short time following the breakdown of the blood-brain barrier (BBB). Both local and peripheral immune cells consequently produce pro-inflammatory mediators and cytokines surrounding the ischemic region (penumbra zone), leading to the early post-ischemic phase<sup>8, 9</sup>.

T-lymphocytes and macrophages appear to increase mainly after the first 24 hours, peaking around the third day<sup>10, 11</sup>. They are located in ischemic areas, typically near blood vessels. Although the function of these infiltrative cells is not well understood, T-cells are considered neurotoxic effectors and cytokines produced by macrophages play an important role in promoting and perpetuating brain damage<sup>8, 10, 11, 12</sup>. It is also unclear whether a specific brain antigen is involved in activating T-

lymphocyte infiltration since the post-ischemic inflammatory response is driven by the innate immune system and this may not be antigen-mediated. However, some studies suggest an important role in T-lymphocyte antigen recognition in brain injury, which might have a protective effect and reduce the ischemic area<sup>8, 11, 12</sup>.

For this study, we selected two important biomarkers involved in the post-ischemic inflammatory process: interleukin 23 (IL-23) and interleukin 17 (IL-17).

IL-23 is a cytokine produced primarily by dendritic cells and infiltrating macrophages in ischemic tissue as early as the first day after the brain insult. It activates T-lymphocytes and is involved in the host defense mechanism against extracellular bacteria, fungi and viruses, as well as in the pathogenesis of autoimmune and inflammatory diseases<sup>13</sup>. IL-23 induces IL-17 production by T-lymphocytes with higher blood levels of the latter around the third day after brain injury<sup>8, 11</sup>. IL-23 aggravates neuron damage, astrocyte swelling, and impairs BBB integrity by mechanisms not yet fully understood, but triggered by oxygen and glucose deprivation<sup>14</sup>.

IL-17 is a cytokine that contributes to neurological damage, infarct size, and post-ischemic inflammation<sup>15</sup>. It is secreted by T-lymphocytes (Th17 and  $\gamma\delta$  T-cells) and can induce stromal cells (fibroblasts, endothelial, and epithelial cells) to produce IL-6, IL-8, granulocyte colony-stimulating factor, and intercellular adhesion molecules type 1 (ICAM-1)<sup>10, 16, 17</sup>. IL-23 has been reported to be essential in inducing IL-17 production by T-lymphocytes<sup>8, 18</sup>. The IL-17 receptor is expressed in brain cells and modifies various inflammatory responses in the central nervous system<sup>8</sup>. IL-17 also modulates the function of the blood-brain epithelial barrier by promoting the expression of the metalloproteinases matrix (MMPs) and ICAM-1, thereby impairing their integrity by altering membrane permeability<sup>8, 15</sup>.

Based on the inflammatory response of acute ischemic stroke, the specific objectives of this study were the following: (1) to determine whether the serum concentrations of IL-23 and IL-17 correlate with neurologic outcomes, as measured by the NIHSS or mRS during hospital stay, at hospital discharge and after four years; (2) to determine whether serial measurements of IL-23 and IL-17 are useful to predict outcomes and identify the best time to conduct the measurement; (3) to determine whether the serum concentrations of IL-23 and IL-17 correlate with favorable or poor outcome; (4) to determine whether the serum levels of IL-23 and IL-17 correlate with the length of the hospital stay after stroke; and (5) to determine whether the serum

concentrations of IL-23 and IL-17 correlate with the ischemic area size (lacunar *versus* segmental), evaluated by computed tomography.

## **Material and Methods**

### **Design, Patients, and Setting**

This prospective observational study was approved by the National and Institutional Committee of Ethics (CAAE: 54829116.3.0000.5327 and CEP-HCPA: 18-0087). All participants or their legal designees provided written informed consent.

Fifty consecutive patients with acute ischemic stroke admitted to the neurovascular emergency unit or intensive care unit at Hospital de Clínicas de Porto Alegre, a university public hospital located in the southern region of Brazil, within 24 hours of stroke onset were enrolled. The inclusion criteria for the study were patients above 18 years with acute stroke admitted within 24 hours after the onset of symptoms documented by certified neurologists. A computed tomography (CT) scan was routinely performed before study inclusion to exclude patients with intracerebral hemorrhage. Exclusion criteria were patients with terminal cancer or prior definition of treatment limitations. Demographics, clinical characteristics, and previous medication were recorded at the time of enrollment.

Neurological stroke severity and global disability were determined with the NIHSS within 24 hours of the acute event, on the third and fifth day after the stroke, and at the time of hospital discharge. Additionally, the mRS was used at the same times and after four years. The same group of experienced neurologists and a neurointensivist performed all neurological examinations. For outcome analysis, the hospital discharge outcome was dichotomized into favorable (NIHSS  $\leq 6$  and mRS  $\leq 2$ ) and poor outcome (NIHSS  $> 6$  and mRS  $> 2$ ). The same mRS dichotomization was used for the evaluation after four years.

All patients provided venous blood samples for IL-23 and IL-17 measurements within 24 hours of the acute event and on the third and fifth day after the stroke. Twenty healthy volunteers (healthcare professionals working on-duty shifts at the same hospital) with similar risk factors provided a single blood sample for comparison of baseline biomarker values with stroke patients. The blood samples were drawn using tubes containing CAT Serum Separator Clot Activator or ethylenediamine tetraacetic

acid (EDTA) and were immediately delivered to the laboratory. Plasma and serum were quickly isolated from the whole blood via centrifugation (4500 rpm for ten minutes) and the samples were stored at -80 °C for later analysis. The levels of IL-23 and IL-17 were determined with a sandwich-ELISA using monoclonal antibodies specific for each marker (IL-23: Human DuoSet ELISA R&D Systems, DY1290-05; IL-17: Human ELISA Kit MyBioSource, MBS355268) according to the manufacturer's instructions.

### **Statistical Analysis**

Continuous data are described as means±standard deviations (SD). Categorical data are expressed as counts and percentages. When distributional assumptions were uncertain, we used the median and interquartile range (P25<sup>th</sup> to P75<sup>th</sup>). The predictive ability of biomarkers for favorable and poor outcomes is expressed as the area under the ROC curve (AUC) followed by its 95% confidence interval.

To evaluate changes in biomarkers during the observational period and the dichotomization of severity scores, we used a generalized estimating equations (GEE) model with a gamma log link function because the response variables were skewed. Simple bivariate comparisons between groups were conducted using the rank sum test (Mann-Whitney test). Correlations between quantitative variables were assessed using Spearman's rank correlation coefficient.

The significance level of this study was set to  $\alpha=0.05$ . The data were analyzed using IBM-SPSS version 22.0.

### **Results**

Fifty consecutive patients (27 men, 23 women) who met the inclusion criteria and did not meet any criterion for exclusion were enrolled. The mean age±SD of the patients was 62±13 years. The median NIHSS score on admission was 7 (range 4–14) and only 30% of the patients were treated with intravenous rt-PA due to late arrival time at the hospital and the limited therapeutic window (4.5 hours until the time of inclusion). At hospital discharge the median NIHSS score was 3 (range 1–8) and the median mRS was 1 (range 1–3). After four years, median mRS was 2 (range 1–6) and

mortality was 28% (Table 1). The results showed no significant difference between the mean values of biomarkers considering thrombolized and non-thrombolized patients.

There was a significant increase in median serum concentrations of IL-23 on the fifth day after stroke compared to measurements performed on the first and third day ( $p < 0.001$ ). Regarding IL-17, a significant increase in serum concentrations was observed on the third day compared to the first 24 hours after the acute injury ( $p < 0.001$ ) (Table 2). Serum levels of both biomarkers were measured in 20 healthy volunteers with the same risk factors without a cerebrovascular event for comparison. Significantly different median values were observed in these controls compared to patients after acute ischemic stroke at the three measured time points for IL-23 and only within 24 hours for IL-17 ( $p < 0.01$ ) (Table 3; Figure 1).

Considering the correlation between the selected biomarkers and the stroke scales at the three measured time points, only IL-23 exhibited a weak correlation with mRS within 24 hours ( $r_s = 0.34$ ,  $p = 0.017$ ) (Table 4). In addition, the serum levels of IL-23 within 24 hours presented the best correlation with the neurological outcomes at hospital discharge using mRS, although also this correlation was weak ( $r_s = 0.30$ ,  $p = 0.033$ ) (Table 5).

The patients were subdivided into two groups according the neurological outcome measures: patients with a favorable outcome (NIHSS  $\leq 6$  and mRS  $\leq 2$ ) and patients with a poor outcome (NIHSS  $> 6$  and mRS  $> 2$ ).

Both neurologic scores for favorable outcome (NIHSS  $\leq 6$  and mRS  $\leq 2$ ) at hospital discharge that were related to IL-23 protein within 24 hours and on the fifth day had low predictive value, as expressed using the area under the ROC curve (NIHSS  $\leq 6$  and IL-23 within 24 hours: AUC=0.69; mRS  $\leq 2$  and IL-23 within 24 hours: AUC=0.68; NIHSS  $\leq 6$  and IL-23 on the fifth day: AUC=0.72; mRS  $\leq 2$  and IL-23 on the fifth day: AUC=0.65). The other measurements did not show predictive capacity during the hospital observation time or after four years (Table 6). Moreover, there was no correlation between IL-23 and IL-17 levels with the dichotomization of neurological outcomes at hospital discharge and after four years (Table 7,8, and 9; Figure 2, 3, and 4).

The length of hospital stay did not significantly correlate with IL-23 and IL-17 biomarker measurements (Table 10). Nevertheless, serum IL-17 levels on the fifth day after stroke showed a significant correlation with stroke type and were mainly increased in the lacunar type (Table 11).

## Discussion

Post-ischemic inflammation, triggered by brain cells, infiltrating immune cells, and the various cytokines and mediators produced by these cells, is an essential step in the progression of brain ischemia-reperfusion injury<sup>8</sup>. The cells and cytokines involved in the inflammation process with neurodegenerative or neuroprotective function may add prognostic value to validated stroke scales, despite their still uncertain significance<sup>19</sup>.

For the understanding of the role of IL-23 and IL-17 in the inflammatory response after stroke, we will emphasize here the known mechanism of action related to macrophages and leukocytes.

Release of danger molecules (DAMPs, danger-associated molecular patterns), local expression of pro-inflammatory cytokines, leukocyte adhesion, platelet aggregation, and breakdown of the BBB are initial events after ischemic stroke<sup>8, 20</sup>. These events are followed by infiltration of macrophages, neutrophils, and T- and B-lymphocytes<sup>20</sup>. Peripheral T-cells are composed of 30–40% CD4<sup>+</sup> helper T cells, 20–30%  $\gamma\delta$  T-cells, and 20–30% CD8<sup>+</sup> T-cells. CD4<sup>+</sup> T-cells are classified as Th1, Th2, Th17, and T regulatory (Treg) cells based on their distinct cytokine repertoire. T-cells play important roles in mediating inflammatory responses through the secretion of effector cytokines<sup>17</sup>. CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> T-cells and  $\gamma\delta$  T-cells promote further tissue damage, whereas regulatory T-cells and B-cells are protective<sup>20</sup>. IL-17 is primarily secreted from  $\gamma\delta$  T-cells rather than Th17 cells, but IL-17 production from  $\gamma\delta$  T-cells requires IL-1 $\beta$  and IL-23 stimulation<sup>8, 17</sup>. Treg cells secrete the anti-inflammatory cytokines IL-10 and TGF- $\beta$  to suppress the immune response, maintain immunologic homeostasis, and prevent autoimmunity. Some studies have suggested that Treg cells contribute to repair and recovery after experimental stroke and inhibit atherosclerosis<sup>17, 21</sup>. IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-23, and IL-12 are produced mainly from macrophages and antigen-presenting cells<sup>8, 22</sup>. Toll-like receptors (TLRs) are an essential type of receptor for the innate and non-specific immune response to general pathogens<sup>8</sup>. Recent studies have shown that TLR2 and TLR4 are pivotal for sterile injury-like brain ischemia<sup>8, 23</sup>. TLRs are expressed on leukocytes and brain cells, but whether the effect of TLRs is neurotoxic or neuroprotective seems to depend on the molecules released by the necrotic brain cells (DAMPs) that stimulate or activate them<sup>8, 23</sup>.



In our study we found a significant increase in median serum concentrations of IL-23 on the fifth day after stroke compared to levels measured on the first and third day. We also saw a significant increase in serum concentrations of IL-17 on the third day that persisted until the fifth day compared to the first 24 h after the acute injury. Previous clinical and experimental studies showed an increase in IL-23 and IL-17 as early as one to three days after the stroke, with a tendency for an earlier increase in serum IL-23 levels, followed by an increase in IL-17 levels peaking between five and seven days<sup>8, 15, 16, 24</sup>. The later IL-23 peak found in our study may be due to smaller ischemia volume, since most strokes had volumes of less than 1/3 of the middle cerebral artery area and, consequently, a smaller area of impaired BBB. In these cases, the peripheral measurement of this interleukin may be impaired by only early local increases (CSF or brain tissue)<sup>10, 25</sup>. In addition, the later IL-23 peak may be related to the increased incidence of infections occurring after the first days of the brain event, and could, therefore, be caused by an overlapping infection and post-ischemic inflammatory response, with an increase in circulating macrophages<sup>25, 26</sup>.

The different median values observed in the healthy volunteers compared to patients after acute ischemic stroke at the three measured time points for IL-23 and only within 24 hours for IL-17, but with a peak of IL-23 levels on the fifth day and lower values than expected in the other measures in the patients, could be explained by dynamic changes in percentages of lymphocyte subpopulations. The late IL-23 peak may be associated with an infection overlap after the third day of stroke that influences the cellular immune system<sup>25</sup>. The previous use of aspirin and statins by patients and healthy controls depending on risk factors, as well as these medications onset within the first 24 hours in stroke patients, could have delayed changes in the systemic immune system<sup>26, 27</sup>. Some studies proposed a delayed expression pattern of IL-17 related to neovascularization in the late stage of brain injury, occurring on 5–15 days after the injury<sup>16</sup>. Therefore, as measurements in our study were taken within the first five days after stroke, later elevations of IL-17 could not be detected. The occurrence of elevated basal interleukin serum levels in the healthy controls may be attributed to the volunteers' altered circadian rhythm since they were working in hospital shifts. The immune system is deeply interconnected with the endogenous 24-hour oscillators of the circadian system. Recent reports showed that the function of T-lymphocytes and macrophages is controlled by the circadian system with circadian variation in cytokine synthesis and secretion. Indeed, immune challenges cause various time, gene, and

tissue-specific effects on circadian-regulated factors. The rhythmic expression of cytokines and their receptors could alter the effects of the immune response on the circadian system and environmental circadian disruption seem to increase the pro-inflammatory cytokines response in animal models<sup>28</sup>.

Considering the correlation between the selected biomarkers and stroke scales at the three measured time points and the correlation of these cytokines with the neurological outcomes at hospital discharge, only IL-23 exhibited a weak correlation with mRS within 24 hours in our study. In addition, when the patients were subdivided into two groups employed as neurological outcome measures (favorable outcome [NIHSS  $\leq$  6 and mRS  $\leq$  2] and poor outcome [NIHSS  $>$  6 and mRS  $>$  2]), only IL-23 serum levels showed a low predictive value for favorable outcomes at hospital discharge in all measures. No other significant correlations between IL-23 and IL-17 levels with the dichotomization of neurological outcomes were observed at hospital discharge or after four years. In recent years, several studies have shown a correlation of elevated IL-23 and IL-17 levels with worse post-stroke neurological outcomes and stroke severity<sup>10, 11, 14, 15, 16, 29, 30</sup>. However, accumulating evidence supports a dual role of inflammation during ischemic stroke, displaying neurodegeneration and neuroprotection effects according to the extension and the phase of the disease<sup>9, 31</sup>. The fact that we did not find a significant correlation between serum IL-17 levels and neurological outcomes assessed by stroke scales may be due to early or prior use of antiplatelet drugs and statins that alter the inflammatory response<sup>25</sup>. The use of anti-inflammatory drugs and reperfusion therapies can also interfere with the differentiation of T-lymphocyte subpopulations with increased Treg cells that contribute to the down-regulation of IL-17 secretion following ischemic injury<sup>13, 17, 21, 25</sup>. Another factor that should be considered is that our analysis of biomarkers was performed in peripheral blood samples. Studies have shown that cytokine elevations may occur predominantly near the site of injury, mainly in minor lesions with limited BBB breakage<sup>9, 15, 16</sup>. Experimental and autopsy studies have shown that IL-17 is increased in the injured cerebral hemisphere compared to the unaffected hemisphere in animal models and patients with ischemic stroke<sup>15, 16</sup>. In addition, the IL-17 peak may have occurred after the fifth day or may have been affected by severity, duration, or stroke treatments, which may explain why this variation was not detected in our study. It should also be noted that many published studies have been performed in animal models, especially

rats, and there are temporal differences in the inflammatory cascade between humans and animals<sup>13, 16</sup>.

Some studies showed a correlation between pro-inflammatory cytokines IL-23 and IL-17 and the size/type of ischemic stroke<sup>10, 18, 25</sup> and we observed increases of these biomarker levels after stroke. However, a significant correlation was only observed between serum IL-17 levels on the fifth day with stroke type with higher levels in the lacunar type. For data analysis, the tomography performed at the patients' arrival at the hospital was used to determine the infarct volume. This early imaging exam (less than 24 hours after the stroke) may not show the final volume of the infarcted area and consequently reduce the prognostic value of this correlation. The pathogenesis of cerebral ischemia according to the TOAST classification (Trial of ORG 10172 in Acute Stroke Treatment) seems to influence the inflammatory cascade<sup>32</sup>. However, in this study due to the small number of enrolled patients, we did not perform this analysis.

The present study has some limitations that should be considered. This research included a variety of stroke subtypes, infarct location (anterior or posterior circulation), lesion volume, and treatments for acute stroke patients, making a detailed analysis difficult. Patients with infections were not excluded from the study, so an infection may be responsible for part of the observed association between inflammatory markers and outcomes. Patients taking anti-inflammatory drugs were also not excluded, which may have altered the expression of interleukins due to ischemic stroke. We chose two validated and widely used stroke scales to estimate stroke severity and patient outcomes but these scores do not capture all stroke-related impairments. We selected two blood biomarkers involved in the pathophysiology of stroke to verify the association with outcomes after stroke but we did not evaluate the differences between local and serum concentrations, nor the patients' genetic variants that may be involved in the inflammatory response. Therefore, the present results should be confirmed in further larger studies.

## **Conclusion**

The identification of relevant and useful stroke biomarkers presents many challenges and has a great potential to improve the bedside management of the disease. Stroke is a heterogeneous illness in which the peripheral and central inflammatory response plays a crucial role in the brain damage following the initial

ischemic injury. The relationships between the clinical features of cerebral ischemia and the serum levels of interleukins, important components of the inflammatory cascade, may augment the ability of stroke scales in providing prognostic information and aid in clinical decision-making. However, neither IL-23 nor IL-17 had sufficient predictive power to be of clinical use to predict outcome after stroke. There are inherent limitations of a biomarker-based approach for the different phases of the inflammatory process post-stroke that include neurodegeneration and neuroprotection, pathophysiological differences of the stroke mechanism, and individual genetic differences. Thus, a useful clinical prognostic biomarker was not yet identified. This topic requires further study to find an ideal biomarker or a panel of biomarkers for acute ischemic stroke with clinical prognostic capability and the potential to refine short and long-term clinical decisions.

### **Conflict of interest**

There is no conflict of interest.

### **References**

1. Benjamin EJ, Muntner P, Alonso A, Bittencourt MS, Callaway CW, Carson AP, et al; American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart Disease and Stroke Statistics-2019 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2019 Mar; 139(10): e56-e528.
2. Ma H, Campbell BCV, Parsons MW, Churilov L, Levi CR, Hsu C, et al. Thrombolysis Guided by Perfusion Imaging up to 9 Hours after Onset of Stroke. *N Engl J Med*. 2019 May; 380(19): 1795-1803.
3. Tate WJ, Polding LC, Kemp S, Mlynash M, Heit JJ, Marks MP, et al. Thrombectomy Results in Reduced Hospital Stay, More Home-Time, and More Favorable Living Situations in DEFUSE 3. *Stroke*. 2019 Jul 10: STROKEAHA119025165 [Epub ahead of print].
4. Lees KR, Bath PM, Schellinger PD, Kerr DM, Fulton R, Hacke W, et al; European Stroke Organization Outcomes Working Group. Contemporary outcome measures in acute stroke research: choice of primary outcome measure. *Stroke*. 2012 Apr; 43(4): 1163-1170.

5. Whiteley W, Wardlaw J, Dennis M, Lowe G, Rumley A, Sattar N, et al. The use of blood biomarkers to predict poor outcome after acute transient ischemic attack or ischemic stroke. *Stroke*. 2012 Jan; 43(1): 86-91.
6. Dieplinger B, Bocksrucker C, Egger M, Eggers C, Haltmayer M, Mueller T. Prognostic Value of Inflammatory and Cardiovascular Biomarkers for Prediction of 90-Day All-Cause Mortality after Acute Ischemic Stroke-Results from the Linz Stroke Unit Study. *Clin Chem*. 2017 Jun; 63(6): 1101-1109.
7. Hu X, De Silva TM, Chen J, Faraci FM. Cerebral Vascular Disease and Neurovascular Injury in Ischemic Stroke. *Circ Res*. 2017 Feb; 120(3): 449-471.
8. Shichita T, Sakaguchi R, Suzuki M, Yoshimura A. Post-ischemic inflammation in the brain. *Front Immunol*. 2012 May; 3: 132-138.
9. Simats A, García-Berrocso T, Montaner J. Neuroinflammatory biomarkers: From stroke diagnosis and prognosis to therapy. *Biochim Biophys Acta*. 2016 Mar; 1862(3): 411-424.
10. Swardfager W, Winer DA, Herrmann N, Winer S, Lanctôt KL. Interleukin-17 in post-stroke neurodegeneration. *Neurosci Biobehav Rev*. 2013 Mar; 37(3): 436-447.
11. Gelderblom M, Gallizioli M, Ludewig P, Thom V, Arunachalam P, Rissiek B, et al. IL-23 (Interleukin-23)-Producing Conventional Dendritic Cells Control the Detrimental IL-17 (Interleukin-17) Response in Stroke. *Stroke*. 2018 Jan; 49(1): 155-164.
12. Zhao SC, Ma LS, Chu ZH, Xu H, Wu WQ, Liu F. Regulation of microglial activation in stroke. *Acta Pharmacol Sin*. 2017 Apr; 38(4): 445-458.
13. Gelderblom M, Arunachalam P, Magnus T.  $\gamma\delta$  T cells as early sensors of tissue damage and mediators of secondary neurodegeneration. *Front Cell Neurosci*. 2014 Nov; 8: 368-372.
14. Wang M, Zhong D, Zheng Y, Li H, Chen H, Ma S, et al. Damage effect of interleukin (IL)-23 on oxygen-glucose-deprived cells of the neurovascular unit via IL-23 receptor. *Neuroscience*. 2015 Mar; 289: 406-416.
15. Shekar S, Cunningham MW, Pabbidi MR, Wang S, Booz GW, Fan F. Targeting vascular inflammation in ischemic stroke: Recent developments on novel immunomodulatory approaches. *Eur J Pharmacol*. 2018 Aug; 833: 531-544.
16. Li GZ, Zhong D, Yang LM, Sun B, Zhong ZH, Yin YH, et al. Expression of interleukin-17 in ischemic brain tissue. *Scand J Immunol*. 2005 Nov; 62(5): 481-486.
17. Hu Y, Zheng Y, Wu Y, Ni B, Shi S. Imbalance between IL-17A-producing cells and regulatory T cells during ischemic stroke. *Mediators Inflamm*. 2014; 2014: 81345-81352.

18. Zheng Y, Zhong D, Chen H, Ma S, Sun Y, Wang M, et al. Pivotal role of cerebral interleukin-23 during immunologic injury in delayed cerebral ischemia in mice. *Neuroscience*. 2015 Apr; 290: 321-331.
19. Jickling GC, Sharp FR. Biomarker panels in ischemic stroke. *Stroke*. 2015 Mar; 46(3): 915-920.
20. Gelderblom M, Weymar A, Bernreuther C, Velden J, Arunachalam P, Steinbach K, et al. Neutralization of the IL-17 axis diminishes neutrophil invasion and protects from ischemic stroke. *Blood*. 2012 Nov; 120(18): 3793-3802.
21. Li Q, Wang Y, Yu F, Wang YM, Zhang C, Hu C, et al. Peripheral Th17/Treg imbalance in patients with atherosclerotic cerebral infarction. *Int J Clin Exp Pathol*. 2013 May; 6(6):1015-1027.
22. Abbas A, Gregersen I, Holm S, Daissormont I, Bjerkeli V, Krohg-Sørensen K, et al. Interleukin 23 levels are increased in carotid atherosclerosis: possible role for the interleukin 23/interleukin 17 axis. *Stroke*. 2015 Mar; 46(3): 793-799.
23. Chen CJ, Kono H, Golenbock D, Reed G, Akira S, Rock KL. Identification of a key pathway required for the sterile inflammatory response triggered by dying cells. *Nat Med*. 2007 Jul; 13(7): 851-856.
24. Shichita T, Sugiyama Y, Ooboshi H, Sugimori H, Nakagawa R, Takada I, et al. Pivotal role of cerebral interleukin-17-producing gammadeltaT cells in the delayed phase of ischemic brain injury. *Nat Med*. 2009 Aug; 15(8): 946-950.
25. Jiang C, Kong W, Wang Y, Ziai W, Yang Q, Zuo F, et al. Changes in the cellular immune system and circulating inflammatory markers of stroke patients. *Oncotarget*. 2017 Jan; 8(2): 3553-3567.
26. Wang Q, Tang XN, Yenari MA. The inflammatory response in stroke. *J Neuroimmunol*. 2007 Mar; 184(1-2): 53-68.
27. Erbel C, Dengler TJ, Wangler S, Lasitschka F, Bea F, Wambsganss N, et al. Expression of IL-17A in human atherosclerotic lesions is associated with increased inflammation and plaque vulnerability. *Basic Res Cardiol*. 2011 Jan; 106(1): 125-134.
28. Cermakian N, Westfall S, Kiessling S. Circadian clocks and inflammation: reciprocal regulation and shared mediators. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2014 Aug; 62(4): 303-318.
29. Zhong Q, Zhou K, Liang QL, Lin S, Wang YC, Xiong XY, et al. Interleukin-23 Secreted by Activated Macrophages Drives  $\gamma\delta$ T Cell Production of Interleukin-17 to Aggravate Secondary Injury After Intracerebral Hemorrhage. *J Am Heart Assoc*. 2016 Oct; 5(10). pii: e004340. [Epub ahead of print]

30. Li S, Dai Q, Yu J, Liu T, Liu S, Ma L, et al. Identification of IL-17A-derived neural cell type and dynamic changes of IL-17A in serum/CSF of mice with ischemic stroke. *Neurol Res.* 2017 Jun; 39(6): 552-558.
31. Xie L, Li W, Hersh J, Liu R, Yang SH. Experimental ischemic stroke induces long-term T cell activation in the brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2018 Aug 10: 271678X18792372. [Epub ahead of print]
32. Zeng L, He X, Liu J, Wang L, Weng S, Wang Y, et al. Differences of circulating inflammatory markers between large- and small vessel disease in patients with acute ischemic stroke. *Int J Med Sci.* 2013 Aug; 10(10): 1399-1405.

**Table 1 - Baseline characteristics of the study population.**

Characteristics	n=50
Age, years	62±13
Gender, n° (%)	
Male	27 (54)
Female	23 (46)
Ethnic, n° (%)	
White	40 (80)
Black	2 (4)
Miscellanea	8 (16)
Thrombolysis, n° (%)	15 (30)
Type of stroke, n° (%)	
Lacunar	30 (60)
Segmental	20 (40)
Length of stay (days)	10.5 (6.0–16.3)
NIHSS at admission	7 (4–14)
NIHSS at hospital discharge¶	3 (1–8)
mRS at admission	3 (2–4)
mRS at hospital discharge	1 (1–3)
mRS after four years	2 (1–6)
Mortality during hospitalization, n° (%)	4 (8)
Mortality after four years, n° (%)¶	14 (28)

Data are described as mean±standard deviation, counts (percentages) or median (interquartile range: P25 to P75). Abbreviations: NIHSS, National Institutes of Health Stroke Scale; mRS, modified Rankin scale. ¶ n=46.



**Table 2 - Blood biomarkers according to time points of observation, n=50.**

<b>Biomarker</b>	<b>Within 24 hours</b>	<b>Third day</b>	<b>Fifth day¶</b>	<b>p</b>
IL-23	77.53 <sup>a</sup> (28.99–207.35)	77.38 <sup>a</sup> (43.13–138.84)	416.35 <sup>b</sup> (84.67–2047.24)	<0.001
IL-17	31.50 <sup>a</sup> (17.14–57.88)	51.06 <sup>b</sup> (26.04–100.13)	50.63 <sup>b</sup> (27.68–92.60)	<0.001

Data are described as mean and 95% confidence interval (in parentheses). Statistical significance was tested using generalized estimating equations with a log link function (gamma). Different index-letters represent statistically significant differences at post-hoc comparisons. Abbreviations: IL-23, interleukin 23; IL-17, interleukin 17. ¶ n=46.

**Table 3 - Comparison of serum biomarker values between patients with ischemic stroke (cases) and controls.**

<b>Biomarker</b>	<b>Cases (n=50)</b>	<b>Controls (n=20)</b>	<b>p</b>
IL-23 within 24 hours	77.52 (53.78–111.77)	173.50 (95.86–314.05)	0.024
IL-23 on the third day	77.38 (55.23–108.41)	173.50 (100.40–299.83)	0.014
IL-23 on the fifth day	439.32¶ (281.46–685.72)	173.50 (86.78–346.88)	0.027
IL-17 within 24 hours	31.50 (24.31–40.81)	65.46 (43.46–98.60)	0.003
IL-17 on the third day	51.07 (19.17–82.96)	65.46 (15.02–115.90)	0.632
IL-17 on the fifth day	52.81¶ (37.15–75.09)	65.46 (38.39–111.62)	0.510

Data are described as mean and 95% confidence interval (in parentheses). Statistical significance was tested using generalized estimating equations with a log link function (gamma). Abbreviations: IL-23, interleukin 23; IL-17, interleukin 17. ¶ n=46.

**Table 4 - Correlations between biomarkers and stroke scales NIHSS and mRS, n=50.**

Biomarker	Within 24 hours		Third day		Fifth day¶	
	NIHSS	mRS	NIHSS	mRS	NIHSS	mRS
IL-23	0.28 (0.052)	0.34 (0.017)	0.16 (0.285)	0.18 (0.215)	0.18 (0.219)	0.17 (0.254)
IL-17	-0.16 (0.272)	-0.06 (0.676)	0.12 (0.397)	0.13 (0.365)	-0.17 (0.263)	-0.20 (0.182)

Data represent Spearman's rank correlation coefficient (*p* value).

Abbreviations: NIHSS, National Institutes of Health Stroke Scale; mRS, modified Rankin scale; IL-23, interleukin 23; IL-17, interleukin 17. ¶ n=46.

**Table 5 - Correlation matrix between biomarkers and stroke scales NIHSS and mRS at discharge and after four years, n=50.**

Biomarker	NIHSS at discharge	mRS at discharge	mRS after four years
IL-23 within 24 hours	0.19 (0.195)	0.30 (0.033)	0.07 (0.662)
IL-23 on the third day	0.13 (0.396)	0.16 (0.279)	-0.07 (0.621)
IL-23 on the fifth day¶	0.23 (0.137)	0.24 (0.102)	<0.00 (0.981)
IL-17 within 24 hours	-0.04 (0.765)	-0.05 (0.740)	-0.09 (0.530)
IL-17 on the third day	0.19 (0.196)	0.17 (0.236)	-0.07 (0.652)
IL-17 on the fifth day¶	-0.33 (0.029)	-0.25 (0.099)	-0.32 (0.041)

Data are presented as Spearman's rank correlation coefficient (*p* value).

Abbreviations: NIHSS, National Institutes of Health Stroke Scale; mRS, modified Rankin scale; IL-23, interleukin 23; IL-17, interleukin 17. ¶ n=46.

**Table 6** - Values for area under the ROC curve of serum biomarkers for predicting good outcome of stroke scales NIHSS and mRS at discharge and after four years, n=50.

Biomarker	mRS ≤ 2 at discharge	NIHSS ≤ 6 at discharge	mRS ≤ 2 after four years
IL-23 within 24 hours	<b>0.68</b> (0.52–0.84)	<b>0.69</b> (0.51–0.87)	0.53 (0.35–0.71)
IL-23 on the third day	0.58 (0.40–0.76)	0.61 (0.41–0.81)	0.46 (0.28–0.64)
IL-23 on the fifth day¶	<b>0.65</b> (0.57–0.82)	<b>0.72</b> (0.54–0.90)	0.52 (0.34–0.70)
IL-17 within 24 hours	0.44 (0.27–0.62)	0.50 (0.30–0.69)	0.46 (0.29–0.64)
IL-17 on the third day	0.55 (0.38–0.73)	0.54 (0.35–0.73)	0.44 (0.27–0.62)
IL-17 on the fifth day¶	0.36 (0.19–0.53)	0.40 (0.21–0.59)	0.29 (0.13–0.45)

Data are presented as area under the ROC (*Receiver Operating Characteristics*) curve with the 95% confidence interval (in parentheses). Abbreviations: NIHSS, National Institutes of Health Stroke Scale; mRS, modified Rankin scale; IL-23, interleukin 23; IL-17, interleukin 17. ¶ n=46.

**Table 7** - Comparison of serum biomarker values between patients with mRS ≤ 2 vs mRS > 2 at discharge.

Biomarker	mRS ≤ 2 (n=30)	mRS > 2 (n=20)	p
IL-23 within 24 hours	32.33 (17.78–58.79)	145.32 (40.82–517.30)	0.233
IL-23 on the third day	41.85 (23.52–74.47)	130.67 (59.50–287.01)	0.099
IL-23 on the fifth day	69.56¶ (43.35–111.60)	928.57¥ (167.74–5140.26)	0.289
IL-17 within 24 hours	38.05 (16.65–86.96)	21.68 (16.29–28.83)	0.317
IL-17 on the third day	59.72 (23.20–153.75)	38.08 (27.32–53.08)	0.467
IL-17 on the fifth day	63.43¶ (29.25–137.56)	31.40¥ (19.44–50.71)	0.222

Data are described as mean and 95% confidence interval (in parentheses). Statistical significance was tested using generalized estimating equations with a log link function (gamma). Abbreviations: mRS, modified Rankin scale; IL-23, interleukin 23; IL-17, interleukin 17. ¶ n=27, ¥ n=19.

**Table 8- Comparison of serum biomarker values between patients with NIHSS  $\leq$  6 vs NIHSS  $>$  6 at discharge.**

Biomarker	NIHSS $\leq$ 6 (n=34)	NIHSS $>$ 6 (n=13)	<i>p</i>
IL-23 within 24 hours	32.11 (18.79–54.87)	203.13 (51.67–800.52)	0.229
IL-23 on the third day	44.20 (26.45–73.82)	162.99 (63.82–416.22)	0.132
IL-23 on the fifth day	68.76¶ (44.67–105.84)	1369.42 (245.41–7641.48)	0.279
IL-17 within 24 hours	35.21 (15.96–77.67)	23.67 (16.23–34.51)	0.440
IL-17 on the third day	58.09 (24.59–137.18)	38.47 (25.00–59.19)	0.465
IL-17 on the fifth day	58.09¶ (27.31–123.43)	30.41 (17.31–53.43)	0.249

Data are described as mean and 95% confidence interval (in parentheses). Statistical significance was tested using generalized estimating equations with a log link function (gamma). Abbreviations: NIHSS, National Institutes of Health Stroke Scale; IL-23, interleukin 23; IL-17, interleukin 17. ¶ n=30.

**Table 9 - Comparison of serum biomarker values between patients with mRS  $\leq$  2 vs mRS  $>$  2 after four years.**

Biomarker	mRS $\leq$ 2 (n=24)	mRS $>$ 2 (n=22)	<i>p</i>
IL-23 within 24 hours	41.65 (23.02–75.38)	38.50 (25.17–58.91)	0.835
IL-23 on the third day	53.82 (29.93–96.80)	63.58 (37.70–107.25)	0.677
IL-23 on the fifth day	82.43¶ (50.30–135.35)	86.65¥ (60.14–124.85)	0.873
IL-17 within 24 hours	41.89 (16.47–106.59)	20.31 (16.42–25.12)	0.282
IL-17 on the third day	71.06 (26.55–190.19)	29.51 (22.24–39.14)	0.248
IL-17 on the fifth day	72.93¶ (31.66–167.99)	25.54¥ (15.71–41.52)	0.135

Data are described as mean and confidence interval (in parentheses). Statistical significance was tested using generalized estimating equations with a log link function (gamma). Abbreviations: mRS, modified Rankin scale; IL-23, interleukin 23; IL-17, interleukin 17. ¶ n=22, ¥ n=20.

**Table 10 - Correlations between biomarkers and the length of the hospital stay, n=50.**

<b>Biomarker</b>	<b>Length of stay</b>
IL-23 within 24 hours	-0.01 (0.971)
IL-23 on the third day	-0.13 (0.361)
IL-23 on the fifth day¶	-0.15 (0.311)
IL-17 within 24 hours	0.09 (0.529)
IL-17 on the third day	0.26 (0.07)
IL-17 on the fifth day¶	-0.18 (0.226)

Data represent Spearman's rank correlation coefficient (*p* value).  
Abbreviations: IL-23, interleukin 23; IL-17; interleukin 17. ¶ n=46.

**Table 11 - Comparison of serum biomarker values between stroke size (lacunar vs segmental), n=50.**

<b>Biomarker</b>	<b>lacunar</b>	<b>segmental</b>	<b><i>p</i></b>
IL-23 within 24 hours	20.06 (7.86–58.27)	22.19 (10.27–38.80)	0.945
IL-23 on the third day	26.07 (13.05–128.96)	26.47 (11.32–47.25)	0.513
IL-23 on the fifth day¶	39.09 (28.62–171.45)	49.06 (30.10–81.54)	0.938
IL-17 within 24 hours	19.90 (11.52–29.36)	16.33 (13.37–24.87)	0.488
IL-17 on the third day	22.11 (16.07–36.99)	31.97 (15.48–59.41)	0.411
IL-17 on the fifth day¶	56.22 (16.15–75.42)	15.37 (1.02–45.25)	<b>0.013</b>

Data are described as median and interquartile range (P25 to P75).  
Abbreviations: IL-23, interleukin 23; IL-17, interleukin 17. ¶ n=46.

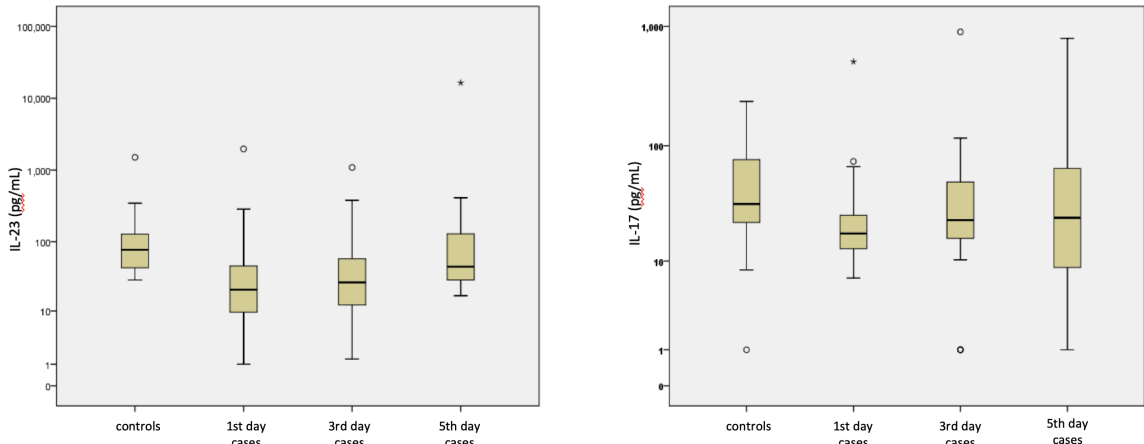


Figure 1: Comparison of serum biomarker values between patients with ischemic stroke (cases) and controls.

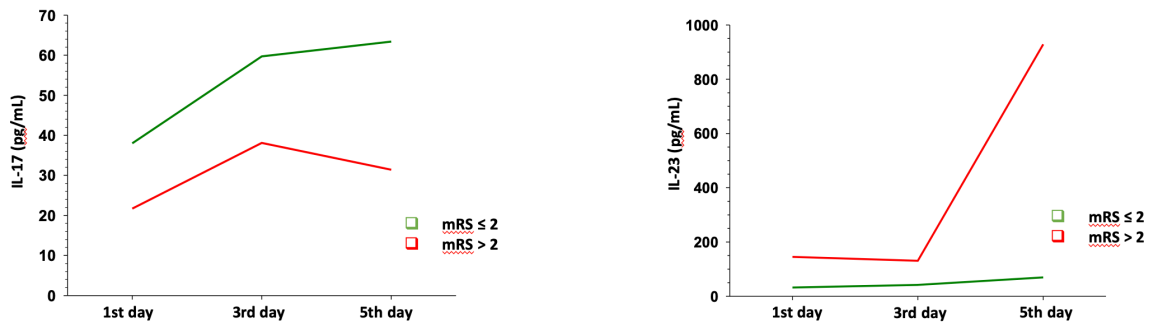


Figure 2: Comparison of serum biomarker values between patients with mRS ≤ 2 vs mRS > 2 at hospital discharge.

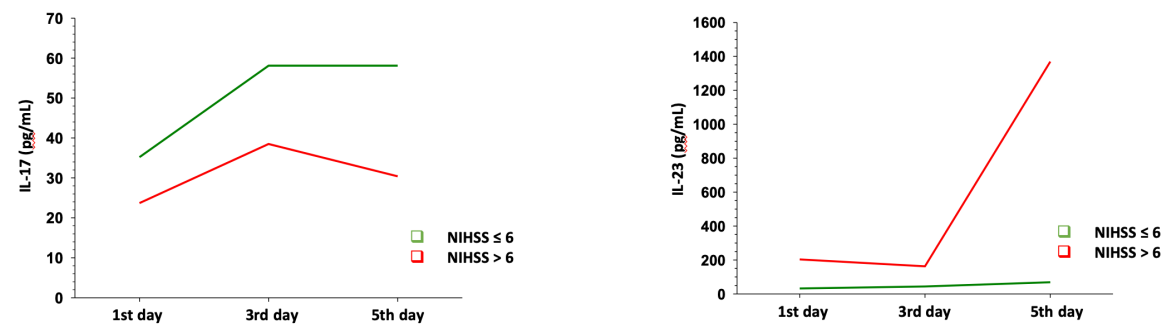


Figure 3: Comparison of serum biomarker values between patients with NIHSS ≤ 6 vs NIHSS > 6 at hospital discharge.

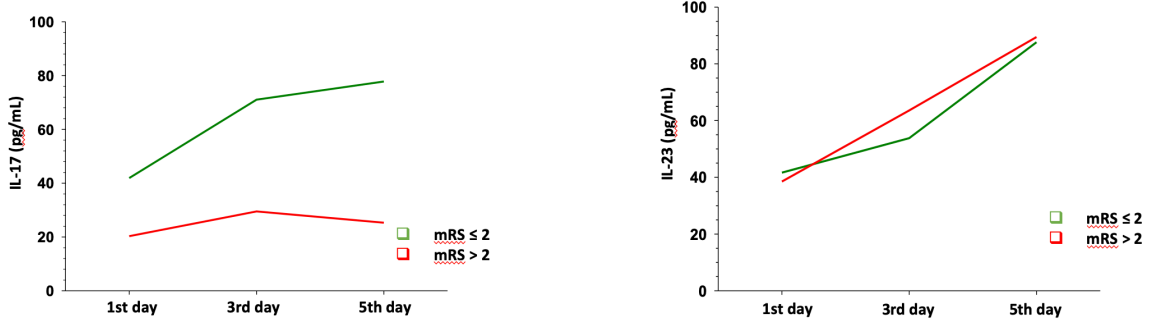


Figure 4: Comparison of serum biomarker values between patients with mRS ≤ 2 vs mRS > 2 in 4 years.

## 9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A idade média dos pacientes com AVC isquêmico incluídos nesse estudo foi de  $62\pm 13$  anos, semelhante a maioria dos centros, apesar de um aumento significativo dos casos de pacientes entre 35 e 44 anos de idade nos últimos anos. A pontuação mediana do NIHSS na admissão foi de 7 (intervalo de 4 a 14) e na alta hospitalar foi de 3 (intervalo de 1 a 8). Apenas 30% dos pacientes foram tratados com rt-PA intravenoso devido ao tempo de chegada tardio ao hospital e à janela terapêutica limitada (4,5 horas até o momento da inclusão), níveis muito abaixo dos desejados, mas superiores a maioria dos hospitais brasileiros e próximos aos encontrados em vários países desenvolvidos. A pontuação mediana da mRS na alta hospitalar foi de 1 (intervalo de 1 a 3) e após 4 anos foi de 2 (intervalo de 1 a 6) com uma taxa de mortalidade de 28%, não superior as estatísticas de 2019 da *American Heart Association* (AHA) (Tabela 1). No entanto, verificamos que os déficits funcionais dos pacientes que apresentaram AVC isquêmico avaliados pela mRS após 4 anos se assemelham aos verificados na internação hospitalar, podendo ser atribuída à falta de reabilitação ou à aceleração do declínio funcional atribuído à idade.

Houve uma mudança significativa nos níveis séricos de TREM-1 entre as dosagens realizadas dentro das primeiras 24 horas, no terceiro dia e no quinto dia após o AVC, com níveis mais altos no terceiro dia. O mesmo não foi observado para as dosagens de TREM-2. Considerando as interleucinas estudadas, ocorreu um aumento significativo nas concentrações séricas de IL-23 no quinto dia após o AVC em comparação às dosagens realizadas no primeiro e terceiro dias. Já em relação à IL-17, foi observado um aumento significativo das concentrações séricas no terceiro dia em comparação às primeiras 24 horas após a lesão aguda (Tabela 2). Os níveis séricos dos mesmos biomarcadores foram medidos em 20 voluntários saudáveis que trabalhavam no hospital de realização do estudo em regime de plantões com os mesmos fatores de risco, mas sem evento cerebrovascular prévio, para comparação. Valores significativamente mais baixos de TREM-1 e TREM-2 foram observados nos controles. No entanto, valores significativamente aumentados de interleucinas foram observados nos controles nos três tempos de mensuração para IL-23 e somente dentro de 24 horas para IL-17, o que pode ser atribuído às alterações causadas pelas mudanças do ritmo circadiano nos controles ou pela SIDS nos casos (Tabela 3).



Considerando a correlação entre esses biomarcadores e as escalas de AVC nos três tempos de avaliação, apenas o TREM-1 exibiu correlação com o NIHSS e mRS dentro de 24 horas e a IL-23 com a mRS dentro de 24 horas, ambas fracas (Tabela 4). Além disso, os níveis séricos de TREM-1 e de IL-23 em 24 horas apresentaram a melhor correlação com os resultados neurológicos na alta hospitalar, embora novamente fracas (Tabela 5).

Os pacientes foram subdivididos em dois grupos, de acordo com os escores NIHSS ( $\text{NIHSS} \leq 6$  e  $\text{NIHSS} > 6$ ) e mRS ( $\text{mRS} \leq 2$  e  $\text{mRS} > 2$ ), para avaliação da severidade e o grau de comprometimento funcional. Ambos os escores neurológicos para resultados favoráveis ( $\text{NIHSS} \leq 6$  e  $\text{mRS} \leq 2$ ) na alta hospitalar associados às dosagens de TREM-1 nas primeiras 24 horas e de IL-23 no mesmo período e no quinto dia apresentaram baixo valor preditivo, expresso pela área da curva ROC. As demais dosagens não apresentaram capacidade preditiva a curto ou longo prazos (Tabela 6).

As concentrações séricas de TREM-1 nas primeiras 24 horas após o AVC foram significativamente maiores em pacientes com desfecho funcional desfavorável ( $\text{mRS} > 2$ ) na alta hospitalar (Tabela 7 e 8). Contudo, não houve correlação entre os biomarcadores selecionados e a dicotomização dos desfechos neurológicos em 4 anos (Tabela 9).

O tempo de internação também não apresentou correlação significativa com os biomarcadores (Tabela 10). Entretanto, os níveis séricos de IL-17 no quinto dia após o AVC apresentaram correlação significativa com o tipo de AVC, aumentados no tipo lacunar (Tabela 11).

Algumas limitações desta pesquisa devem ser consideradas. O presente estudo incluiu diferentes subtipos de AVC, tamanhos do infarto, localização e tratamentos para pacientes com AVC agudo, dificultando uma análise detalhada. Como os pacientes com infecções não foram excluídos do estudo, a infecção pode ser responsável por parte da associação observada entre os marcadores inflamatórios e os resultados. Pacientes em uso de medicamentos anti-inflamatórios também não foram excluídos, o que pode ter alterado a cascata inflamatória após o AVC isquêmico. Usamos escalas de AVC para estimar a gravidade e os resultados funcionais dos pacientes, mas esses escores não capturam todas as perdas e deficiências relacionadas ao AVC. Selecionamos apenas quadro biomarcadores sanguíneos envolvidos na fisiopatologia do AVC para verificar a associação com os resultados após o AVC. Considerando os biomarcadores selecionados, não avaliamos as

diferenças entre as concentrações local e sérica, nem as variantes genéticas que podem estar envolvidas na resposta inflamatória.

A dosagem de biomarcadores sanguíneos mostra-se útil após o AVC agudo, auxiliando na determinação da gravidade do AVC, correlacionando-se com achados clínicos e exames de neuroimagem, bem como aumentando a capacidade prognóstica das escalas neurológicas usadas atualmente. Dentre os biomarcadores estudados, o TREM-1 e a IL-23 apresentaram os resultados mais promissores. No entanto, esses resultados não são suficientemente expressivos para sua aplicação na prática clínica. Portanto, a busca de um biomarcador ou um painel de biomarcadores que aumente a predição de desfechos após o AVC e, conseqüentemente, auxilie na tomada de decisões continua sendo um desafio para clínicos e pesquisadores, sendo necessário mais estudos que explorem a fisiopatologia dessa complexa doença e possibilitem o encontro do biomarcador ideal.

<b>Tabela 1 - Características da população estudada.</b>	
<b>Características</b>	<b>n=50</b>
Idade, anos	62±13
<b>Gênero, n° (%)</b>	
Masculino	27 (54)
Feminino	23 (46)
<b>Etnia, n° (%)</b>	
Branco	40 (80)
Negro	2 (4)
Miscigenados	8 (16)
Trombólise, n° (%)	15 (30)
<b>Tipo de AVC, n° (%)</b>	
Lacunar	30 (60)
Segmentar	20 (40)
Tempo de internação (dias)	10,5 (6,0–16,3)
NIHSS na admissão	7 (4–4)
NIHSS na alta hospitalar¶	3 (1–8)
mRS na admissão	3 (2–4)
mRS na alta hospitalar	1 (1–3)
mRS após 4 anos	2 (1–6)
Mortalidade durante a hospitalização, n° (%)	4 (8)
Mortalidade após 4 anos, n° (%)¶	14 (28)

Os dados são descritos como média ± desvio padrão, contagem (porcentagem) ou mediana (intervalo interquartil: P25 a P75). Abreviações: NIHSS, *National Institutes of Health Stroke Scale*; mRS, escala de Rankin modificada. ¶ n=46.

**Tabela 2 - Comparações dos valores dos biomarcadores entre os momentos de mensuração, n=50.**

<b>Biomarcador</b>	<b>Até 24h</b>	<b>Terceiro dia</b>	<b>Quinto dia<sup>¶</sup></b>	<b>p</b>
TREM-1	68,10 <sup>a</sup> (57,39–80,81)	136,62 <sup>b</sup> (116,52–160,18)	47,46 <sup>c</sup> (38,64–58,29)	<b>&lt;0,001</b>
TREM-2	445,26 (304,68–650,68)	389,17 (256,74–589,89)	479,47 (303,70–756,99)	0,306
IL-23	77,53 <sup>a</sup> (28,99–207,35)	77,38 <sup>a</sup> (43,13–138,84)	416,35 <sup>b</sup> (84,67–2047,24)	<b>&lt;0,001</b>
IL-17	31,50 <sup>a</sup> (17,14–57,88)	51,06 <sup>b</sup> (26,04–100,13)	50,63 <sup>b</sup> (27,68–92,60)	<b>&lt;0,001</b>

Os dados foram descritos como média e intervalo de confiança de 95% (entre parênteses). A significância estatística foi obtida utilizando-se equações de estimativa generalizadas com uma função log link (gama). Letras de índice diferentes representam diferenças estatísticas em comparações post-hoc. Abreviações: TREM-1, receptor desencadeador expresso nas células mielóides 1; TREM-2, receptor desencadeador expresso em células mielóides 2; IL-23, interleucina 23; IL 17, interleucina 17. ¶ n=46.

**Tabela 3** - Comparações dos valores dos biomarcadores entre pacientes com AVC isquêmico (casos) e controles.

<b>Biomarcador</b>	<b>Casos (n=50)</b>	<b>Controles (n=20)</b>	<b>p</b>
TREM-1 nas primeiras 24h	68,10 (56,77–81,69)	30,01 (22,51–40,02)	<b>&lt;0,001</b>
TREM-1 no terceiro dia	136,62 (115,44–161,68)	30,01 (23,00–39,17)	<b>&lt;0,001</b>
TREM-1 no quinto dia	47,83¶ (39,36–58,12)	30,01 (22,33–40,34)	<b>&lt;0,010</b>
TREM-2 nas primeiras 24h	445,26 (341,04–581,32)	88,02 (57,74–134,19)	<b>&lt;0,001</b>
TREM-2 no terceiro dia	389,17 (291,24–520,03)	88,02 (55,66–139,20)	<b>&lt;0,001</b>
TREM-2 no quinto dia	432,86¶ (311,29–601,90)	88,02 (53,68–144,34)	<b>&lt;0,001</b>
IL-23 nas primeiras 24h	77,52 (53,78–111,77)	173,50 (95,86–314,05)	<b>0,024</b>
IL-23 no terceiro dia	77,38 (55,23–108,41)	173,50 (100,40–299,83)	<b>0,014</b>
IL-23 no quinto dia	439,32¶ (281,46–685,72)	173,50 (86,78–346,88)	<b>0,027</b>
IL-17 nas primeiras 24h	31,50 (24,31–40,81)	65,46 (43,46–98,60)	<b>0,003</b>
IL-17 no terceiro dia	51,07 (19,17–82,96)	65,46 (15,02–115,90)	0,632
IL-17 no quinto dia	52,81¶ (37,15–75,09)	65,46 (38,39–111,62)	0,510

Os dados foram descritos como média e intervalo de confiança de 95% (entre parênteses). A significância estatística foi obtida utilizando-se equações de estimativa generalizadas com uma função log link (gama). Abreviações: TREM-1, receptor desencadeador expresso nas células mielóides 1; TREM-2, receptor desencadeador expresso em células mielóides 2; IL-23, interleucina 23; IL 17, interleucina 17. ¶ n=46.

Tabela 4 - Correlações entre os biomarcadores e as escalas de AVC NIHSS e mRS, n=50.						
Biomarcador	Até 24h		Terceiro dia		Quinto dia¶	
	NIHSS	mRS	NIHSS	mRS	NIHSS	mRS
TREM-1	0,31 (0,029)	0,32 (0,023)	0,13 (0,362)	0,08 (0,556)	-0,05 (0,717)	-0,14 (0,359)
TREM-2	-0,11 (0,462)	-0,07 (0,617)	-0,09 (0,522)	-0,09 (0,516)	-0,23 (0,129)	-0,27 (0,078)
IL-23	0,28 (0,052)	0,34 (0,017)	0,16 (0,285)	0,18 (0,215)	0,18 (0,219)	0,17 (0,254)
IL-17	-0,16 (0,272)	-0,06 (0,676)	0,12 (0,397)	0,13 (0,365)	-0,17 (0,263)	-0,20 (0,182)

Os dados são apresentados como coeficiente de correlação de Spearman (valor de *p*).  
 Abreviações: NIHSS, *National Institutes of Health Stroke Scale*; mRS, escala de Rankin modificada; TREM-1, receptor desencadeador expresso em células mielóides 1; TREM-2, receptor desencadeador expresso em células mielóides 2; IL-23, interleucina 23; IL 17, interleucina 17. ¶ n=46.

**Tabela 5 - Matriz de correlação entre os biomarcadores e as escalas de AVC NHISS e mRS na alta hospitalar e após 4 anos, n=50.**

Biomarcador	NIHSS na alta	mRS na alta	mRS após 4 anos
TREM-1 nas primeiras 24h	0,34 (0,021)	0,27 (0,049)	0,08 (0,590)
TREM-1 no terceiro dia	0,11 (0,468)	0,03 (0,807)	-0,04 (0,772)
TREM-1 no quinto dia¶	-0,10 (0,515)	-0,17 (0,250)	0,04 (0,805)
TREM-2 nas primeiras 24h	-0,06 (0,691)	-0,12 (0,387)	0,13 (0,382)
TREM-2 no terceiro dia	-0,15 (0,312)	-0,27 (0,054)	-0,18 (0,226)
TREM-2 no quinto dia¶	-0,24 (0,122)	-0,30 (0,046)	-0,11 (0,475)
IL-23 nas primeiras 24h	0,19 (0,195)	0,30 (0,033)	0,07 (0,662)
IL-23 no terceiro dia	0,13 (0,396)	0,16 (0,279)	-0,07 (0,621)
IL-23 no quinto dia¶	0,23 (0,137)	0,24 (0,102)	<0,00 (0,981)
IL-17 nas primeiras 24h	-0,04 (0,765)	-0,05 (0,740)	-0,09 (0,530)
IL-17 no terceiro dia	0,19 (0,196)	0,17 (0,236)	-0,07 (0,652)
IL-17 no quinto dia¶	-0,33 (0,029)	-0,25 (0,099)	-0,32 (0,041)

Os dados são apresentados como coeficiente de correlação de Spearman (valor de *p*).  
 Abreviações: NIHSS, *National Institutes of Health Stroke Scale*; mRS, escala de Rankin modificada; TREM-1, receptor desencadeador expresso em células mielóides 1; TREM-2, receptor desencadeador expresso em células mielóides 2; IL-23, interleucina 23; IL 17, interleucina 17. ¶ n=46.

**Tabela 6** - Valores para área da curva ROC dos biomarcadores na predição de desfecho neurológico favorável pelas escalas de AVC NIHSS e mRS na alta hospitalar e após 4 anos, n=50.

Biomarcador	mRS ≤ 2 na alta	NIHSS ≤ 6 na alta	mRS ≤ 2 após 4 anos
TREM-1 nas primeiras 24h	<b>0,67</b> (0,50–0,83)	<b>0,64</b> (0,56–0,83)	0,56 (0,38–0,74)
TREM-1 no terceiro dia	0,56 (0,39–0,73)	0,52 (0,38–0,72)	0,44 (0,26–0,62)
TREM-1 no quinto dia¶	0,44 (0,26–0,61)	0,51 (0,32–0,70)	0,55 (0,37–0,73)
TREM-2 nas primeiras 24h	0,38 (0,21–0,54)	0,45 (0,25–0,65)	0,47 (0,29–0,65)
TREM-2 no terceiro dia	0,32 (0,15–0,48)	0,35 (0,14–0,56)	0,37 (0,19–0,56)
TREM-2 no quinto dia¶	0,35 (0,18–0,52)	0,37 (0,17–0,56)	0,42 (0,24–0,60)
IL-23 nas primeiras 24h	<b>0,68</b> (0,52–0,84)	<b>0,69</b> (0,51–0,87)	0,53 (0,35–0,71)
IL-23 no terceiro dia	0,58 (0,40–0,76)	0,61 (0,41–0,81)	0,46 (0,28–0,64)
IL-23 no quinto dia¶	<b>0,65</b> (0,57–0,82)	<b>0,72</b> (0,54–0,90)	0,52 (0,34–0,70)
IL-17 nas primeiras 24h	0,44 (0,27–0,62)	0,50 (0,30–0,69)	0,46 (0,29–0,64)
IL-17 no terceiro dia	0,55 (0,38–0,73)	0,54 (0,35–0,73)	0,44 (0,27–0,62)
IL-17 no quinto dia¶	0,36 (0,19–0,53)	0,40 (0,21–0,59)	0,29 (0,13–0,45)

Os dados representam a área da curva ROC (*Receiver Operating Characteristics*) com intervalo de confiança de 95% (entre parênteses). Abreviações: NIHSS, *National Institutes of Health Stroke Scale*; mRS, escala de Rankin modificada; TREM-1, receptor desencadeador expresso em células mielóides 1; TREM-2, receptor desencadeador expresso em células mielóides 2; IL-23, interleucina 23; IL 17, interleucina 17. ¶ n=46.



<b>Tabela 7 - Comparação dos valores dos biomarcadores entre pacientes com mRS <math>\leq</math> 2 e mRS <math>&gt;</math> 2 na alta hospitalar.</b>			
<b>Biomarcador</b>	<b>mRS <math>\leq</math> 2 (n=30)</b>	<b>mRS <math>&gt;</math> 2 (n=20)</b>	<b>p</b>
TREM-1 nas primeiras 24h	56,69 (46,22–69,52)	85,22 (66,36–109,44)	<b>0,021</b>
TREM-1 no terceiro dia	131,92 (105,89–164,35)	143,66 (114,71–179,92)	0,596
TREM-1 no quinto dia	50,01¶ (38,42–65,08)	43,79¥ (31,65–60,58)	0,529
TREM-2 nas primeiras 24h	552,88 (341,30–895,63)	283,81 (199,70–403,36)	0,064
TREM-2 no terceiro dia	459,14 (284,76–740,31)	284,21 (127,42–633,94)	0,279
TREM-2 no quinto dia	596,96¶ (346,51–1028,44)	319,05¥ (142,68–713,39)	0,188
IL-23 nas primeiras 24h	32,33 (17,78–58,79)	145,32 (40,82–517,30)	0,233
IL-23 no terceiro dia	41,85 (23,52–74,47)	130,67 (59,50–287,01)	0,099
IL-23 no quinto dia	69,56¶ (43,35–111,60)	928,57¥ (167,74–5140,26)	0,289
IL-17 nas primeiras 24h	38,05 (16,65–86,96)	21,68 (16,29–28,83)	0,317
IL-17 no terceiro dia	59,72 (23,20–153,75)	38,08 (27,32–53,08)	0,467
IL-17 no quinto dia	63,43¶ (29,25–137,56)	31,40¥ (19,44–50,71)	0,222

Os dados foram descritos como média e intervalo de confiança de 95% (entre parênteses). A significância estatística foi obtida utilizando-se equações de estimativa generalizadas com uma função log link (gama). Abreviações: TREM-1, receptor desencadeador expresso nas células mielóides 1; TREM-2, receptor desencadeador expresso em células mielóides 2; IL-23, interleucina 23; IL 17, interleucina 17. ¶ n=27, ¥ n=19.

<b>Tabela 8- Comparação dos valores dos biomarcadores entre pacientes com NIHSS <math>\leq</math> 6 e NIHSS <math>&gt;</math> 6 na alta hospitalar.</b>			
<b>Biomarcador</b>	<b>NIHSS <math>\leq</math> 6 (n=34)</b>	<b>NIHSS <math>&gt;</math> 6 (n=13)</b>	<b>p</b>
TREM-1 nas primeiras 24h	62,28 (49,95–77,67)	85,03 (65,19–110,91)	0,092
TREM-1 no terceiro dia	137,79 (112,38–168,94)	139,32 (106,93–181,52)	0,948
TREM-1 no quinto dia	48,41¶ (37,41–62,63)	50,01 (34,87–71,74)	0,886
TREM-2 nas primeiras 24h	486,46 (302,46–782,40)	388,07 (218,22–690,13)	0,549
TREM-2 no terceiro dia	394,96 (247,90–629,26)	438,50 (181,28–1060,71)	0,842
TREM-2 no quinto dia	443,83¶ (295,59–666,42)	617,69 (222,44–1715,24)	0,604
IL-23 nas primeiras 24h	32,11 (18,79–54,87)	203,13 (51,67–800,52)	0,229
IL-23 no terceiro dia	44,20 (26,45–73,82)	162,99 (63,82–416,22)	0,132
IL-23 no quinto dia	68,76¶ (44,67–105,84)	1369,42 (245,41–7641,48)	0,279
IL-17 nas primeiras 24h	35,21 (15,96–77,67)	23,67 (16,23–34,51)	0,440
IL-17 no terceiro dia	58,09 (24,59–137,18)	38,47 (25,00–59,19)	0,465
IL-17 no quinto dia	58,09¶ (27,31–123,43)	30,41 (17,31–53,43)	0,249

Os dados foram descritos como média e intervalo de confiança de 95% (entre parênteses). A significância estatística foi obtida utilizando-se equações de estimativa generalizadas com uma função log link (gama). Abreviações: NIHSS, *National Institutes of Health Stroke Scale*; TREM-1, receptor desencadeador expresso nas células mielóides 1; TREM-2, receptor desencadeador expresso em células mielóides 2; IL-23, interleucina 23; IL 17, interleucina 17. ¶ n=30.

<b>Tabela 9 - Comparação dos valores dos biomarcadores entre pacientes com mRS <math>\leq</math> 2 e mRS <math>&gt;</math> 2 após 4 anos.</b>			
<b>Biomarcador</b>	<b>mRS <math>\leq</math> 2 (n=24)</b>	<b>mRS <math>&gt;</math> 2 (n=22)</b>	<b>p</b>
TREM-1 nas primeiras 24h	63,00 (49,57–80,07)	75,51 (58,14–98,08)	0,324
TREM-1 no terceiro dia	145,97 (116,89–182,30)	131,72 (103,17–168,16)	0,541
TREM-1 no quinto dia	46,57¶ (32,83–66,07)	46,58¥ (35,21–61,64)	0,999
TREM-2 nas primeiras 24h	391,25 (252,75–605,64)	517,82 (274,06–978,41)	0,504
TREM-2 no terceiro dia	428,27 (236,63–775,12)	366,48 (191,08–702,87)	0,728
TREM-2 no quinto dia	441,14¶ (264,06–736,97)	571,27¥ (272,35–1198,24)	0,595
IL-23 nas primeiras 24h	41,65 (23,02–75,38)	38,50 (25,17–58,91)	0,835
IL-23 no terceiro dia	53,82 (29,93–96,80)	63,58 (37,70–107,25)	0,677
IL-23 no quinto dia	82,43¶ (50,30–135,35)	86,65¥ (60,14–124,85)	0,873
IL-17 nas primeiras 24h	41,89 (16,47–106,59)	20,31 (16,42–25,12)	0,282
IL-17 no terceiro dia	71,06 (26,55–190,19)	29,51 (22,24–39,14)	0,248
IL-17 no quinto dia	72,93¶ (31,66–167,99)	25,54¥ (15,71–41,52)	0,135

Os dados foram descritos como média e intervalo de confiança de 95% (entre parênteses). A significância estatística foi obtida utilizando-se equações de estimativa generalizadas com uma função log link (gama). Abreviações: mRS, modified Rankin scale; TREM-1, receptor desencadeador expresso nas células mielóides 1; TREM-2, receptor desencadeador expresso em células mielóides 2; IL-23, interleucina 23; IL 17, interleucina 17. ¶ n=22, ¥ n=20.

**Tabela 10 - Correlação entre os biomarcadores e o tempo de internação hospitalar, n=50.**

<b>Biomarcador</b>	<b>Tempo de internação</b>
TREM-1 nas primeiras 24h	0,14 (0,326)
TREM-1 no terceiro dia	0,05 (0,747)
TREM-1 no quinto dia¶	0,19 (0,203)
TREM-2 nas primeiras 24h	-0,01 (0,945)
TREM-2 no terceiro dia	-0,03 (0,825)
TREM-2 no quinto dia¶	-0,21 (0,156)
IL-23 nas primeiras 24h	-0,01 (0,971)
IL-23 no terceiro dia	-0,13 (0,361)
IL-23 no quinto dia¶	-0,15 (0,311)
IL-17 nas primeiras 24h	0,09 (0,529)
IL-17 no terceiro dia	0,26 (0,07)
IL-17 no quinto dia¶	-0,18 (0,226)

Os dados são apresentados como coeficiente de correlação de Spearman (valor de  $p$ ). Abreviações: NIHSS, National Institutes of Health Stroke Scale; mRS, escala Rankin modificada; TREM-1, receptor desencadeador expresso em células mielóides 1; TREM-2, receptor desencadeador expresso em células mielóides 2; IL-23, interleucina 23; IL 17, interleucina 17. ¶ n=46.

**Tabela 11 - Comparação dos valores dos biomarcadores entre os tamanhos de AVC (lacunar e segmentar), n=50.**

<b>Biomarcador</b>	<b>lacunar</b>	<b>segmentar</b>	<b>p</b>
TREM-1 nas primeiras 24h	61,05 (32,42–83,10)	72,62 (39,08–94,91)	0,289
TREM-1 no terceiro dia	131,04 (75,87–180,35)	123,31 (68,75–158,92)	0,458
TREM-1 no quinto dia¶	41,45 (29,03–76,41)	33,77 (19,37–61,31)	0,184
TREM-2 nas primeiras 24h	234,83 (107,76–527,94)	312,42 (125,08–525,95)	0,766
TREM-2 no terceiro dia	195,82 (105,45–414,18)	187,59 (112,36–382,53)	0,874
TREM-2 no quinto dia¶	274,34 (133,77–429,35)	141,18 (73,27–327,42)	0,141
IL-23 nas primeiras 24h	20,06 (7,86–58,27)	22,19 (10,27–38,80)	0,945
IL-23 no terceiro dia	26,07 (13,05–128,96)	26,47 (11,32–47,25)	0,513
IL-23 no quinto dia¶	39,09 (28,62–171,45)	49,06 (30,10–81,54)	0,938
IL-17 nas primeiras 24h	19,90 (11,52–29,36)	16,33 (13,37–24,87)	0,488
IL-17 no terceiro dia	22,11 (16,07–36,99)	31,97 (15,48–59,41)	0,411
IL-17 no quinto dia¶	56,22 (16,15–75,42)	15,37 (1,02–45,25)	<b>0,013</b>

Os dados foram descritos como mediana e amplitude interquartil (P25 a P75).

Abreviações: TREM-1, receptor desencadeador expresso nas células mielóides 1; TREM-2, receptor desencadeador expresso em células mielóides 2; IL-23, interleucina 23; IL 17, interleucina 17.

¶ n=46.

## 10. PERSPECTIVAS FUTURAS

Apesar da complexidade do AVC isquêmico e das diferentes etiologias que levam à redução do fluxo sanguíneo cerebral responsável pela lesão primária, a inflamação desempenha um papel crucial na fisiopatologia da lesão secundária não se restringindo ao local da lesão, mas podendo comprometer globalmente o cérebro. Há evidências de que a autorregulação da cascata inflamatória desencadeada pelo infarto inicial, ainda não bem compreendida, exerce funções neurodegenerativas, principalmente quando prolongada, mas ao mesmo tempo está envolvida na neuroproteção e na neuroplasticidade.

O progressivo entendimento do processo de inflamação e a identificação de biomarcadores sensíveis, específicos, acurados, facilmente mensurados após o evento agudo e que acrescentem valor prognóstico às escalas de AVC validadas e já amplamente utilizadas, poderá auxiliar na tomada de decisões quanto ao tratamento, na redução da necessidade de exames de imagem sequências, na monitorização dos déficits ao longo do tempo de acompanhamento e no planejamento das medidas de reabilitação. Além disso, irá contribuir para definição das expectativas do paciente, dos membros da família envolvidos e dos profissionais de saúde, bem como para programação dos custos relacionados à doença.

Apesar dos avanços nos tratamentos do AVC com ênfase nas medidas de reperfusão, a mortalidade e a morbidade dessa doença continuam elevadas, em parte porque muitos pacientes chegam ao hospital tardiamente, quando esses tratamentos não são mais indicados, mas certamente ainda estão ocorrendo danos inflamatórios regionais e globais cerebrais. Portanto, pesquisas futuras devem, a partir da identificação de biomarcadores chaves do processo inflamatório, modular a cascata inflamatória, reduzindo a liberação de mediadores pró-inflamatórios e aumentando os mediadores anti-inflamatórios nas fases aguda e subaguda do AVC, a fim de reduzir as sequelas neurológicas. Estudos iniciais com uso de terapias imunomoduladoras e a identificação de genes e moléculas responsáveis pela inflamação que podem ter seu mecanismo alterado por novas medicações estão em andamento, mas ainda sem repercussão na prática clínica. Entretanto, os dados atuais sugerem que a identificação de biomarcadores para avaliação prognóstica e novas estratégias terapêuticas baseadas na modulação da cascata inflamatória podem melhorar os desfechos funcionais dos pacientes vítimas dessa grave doença.

## 11. ANEXOS

### 11.1 NIHSS - National Institutes of Health Stroke Scale

**NIH**  
**STROKE**  
**SCALE**

Identificação do Paciente

Nome: \_\_\_\_\_

Registro: \_\_\_\_\_

Exame inicial: Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Instrução	Definição da escala	Escore	Hora
<p><b>1a. Nível de Consciência</b> O investigador deve escolher uma resposta mesmo se uma avaliação completa é prejudicada por obstáculos como um tubo orotraqueal, barreiras de linguagem, trauma ou curativo orotraqueal. Um 3 é dado apenas se o paciente não faz nenhum movimento (outro além de postura reflexa) em resposta à estimulação dolorosa.</p>	<p>0 = Alerta; reponde com entusiasmo. 1 = Não alerta, mas ao ser acordado por mínima estimulação obedece, responde ou reage. 2 = Não alerta, requer repetida estimulação ou estimulação dolorosa para realizar movimentos (não estereotipados). 3 = Responde somente com reflexo motor ou reações autonômicas, ou totalmente irresponsivo, flácido e arreflexo.</p>	<p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p>	<p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p>
<p><b>1b. Perguntas de Nível de Consciência</b> O paciente é questionado sobre o mês e sua idade. A resposta deve ser correta - não há nota parcial por chegar perto. Pacientes com afasia ou esturpor que não compreendem as perguntas irão receber 2. Pacientes incapacitados de falar devido a intubação orotraqueal, trauma orotraqueal, disartria grave de qualquer causa, barreiras de linguagem ou qualquer outro problema não secundário a afasia receberão um 1. É importante que somente a resposta inicial seja considerada e que o examinador não "ajude" o paciente com dicas verbais ou não verbais.</p>	<p>0 = Responde ambas as questões corretamente. 1 = Responde uma questão corretamente. 2 = Não responde nenhuma questão corretamente.</p>	<p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p>	<p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p>
<p><b>1c. Comandos de Nível de Consciência</b> O paciente é solicitado a abrir e fechar os olhos e então abrir e fechar a mão não parética. Substitua por outro comando de um único passo se as mãos não podem ser utilizadas. É dado crédito se uma tentativa inequívoca é feita, mas não completada devido à fraqueza. Se o paciente não responde ao comando, a tarefa deve ser demonstrada a ele (pantomima) e o resultado registrado (i.e., segue um, nenhum ou ambos os comandos). Aos pacientes com trauma, amputação ou outro impedimento físico devem ser dados comandos únicos compatíveis. Somente a primeira tentativa é registrada.</p>	<p>0 = Realiza ambas as tarefas corretamente. 1 = Realiza uma tarefa corretamente. 2 = Não realiza nenhuma tarefa corretamente.</p>	<p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p>	<p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p>
<p><b>2. Melhor olhar conjugado</b> Somente os movimentos oculares horizontais são testados. Movimentos oculares voluntários ou reflexos (óculo-cefálico) recebem nota, mas a prova calórica não é usada. Se o paciente tem um desvio conjugado do olhar, que pode ser sobreposto por atividade voluntária ou reflexa, o escore será 1. Se o paciente tem uma paresia de nervo periférica isolada (NC III, IV ou VI), marque 1. O olhar é testado em todos os pacientes afásicos. Os pacientes com trauma ocular, curativos, cegueira preexistente ou outro distúrbio de acuidade ou campo visual devem ser testados com movimentos reflexos e a escolha feita pelo investigador. Estabelecer contato visual e, então, mover-se perto do paciente de um lado para outro, pode esclarecer a presença de paralisia do olhar.</p>	<p>0 = Normal. 1 = Paralisia parcial do olhar. Este escore é dado quando o olhar é anormal em um ou ambos os olhos, mas não há desvio forçado ou paresia total do olhar. 2 = Desvio forçado ou paralisia total do olhar que não podem ser vencidos pela manobra óculo-cefálica.</p>	<p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p>	<p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p>

Instrução	Definição da escala	Escore	Hora
<p><b>3. Visual</b> OS campos visuais (quadrantes superiores e inferiores) são testados por confrontação, utilizando contagem de dedos ou ameaça visual, conforme apropriado. O paciente deve ser encorajado, mas se olha para o lado do movimento dos dedos, deve ser considerado como normal. Se houver cegueira unilateral ou enucleação, os campos visuais no olho restante são avaliados. Marque 1 somente se uma clara assimetria, incluindo quadrantanopsia, for encontrada. Se o paciente é cego por qualquer causa, marque 3. Estimulação dupla simultânea é realizada neste momento. Se houver uma extinção, o paciente recebe 1 e os resultados são usados para responder a questão 11.</p>	<p>0 = Sem perda visual. 1 = Hemianopsia parcial. 2 = Hemianopsia completa. 3 = Hemianopsia bilateral (cego, incluindo cegueira cortical).</p>	<p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p>	<p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p>
<p><b>4. Paralisia Facial</b> Pergunte ou use pantomima para encorajar o paciente a mostrar os dentes ou sorrir e fechar os olhos. Considere a simetria de contração facial em resposta a estímulo doloroso em paciente pouco responsivo ou incapaz de compreender. Na presença de trauma /curativo facial, tubo orotraqueal, esparadrapo ou outra barreira física que obscureça a face, estes devem ser removidos, tanto quanto possível.</p>	<p>0 = Movimentos normais simétricos. 1 = Paralisia facial leve (apagamento de prega nasolabial, assimetria no sorriso). 2 = Paralisia facial central evidente (paralisia facial total ou quase total da região inferior da face). 3 = Paralisia facial completa (ausência de movimentos faciais das regiões superior e inferior da face).</p>	<p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p>	<p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p>
<p><b>5. Motor para braços</b> O braço é colocado na posição apropriada: extensão dos braços (palmas para baixo) a 90° (se sentado) ou a 45° (se deitado). É valorizada queda do braço se esta ocorre antes de 10 segundos. O paciente afásico é encorajado através de firmeza na voz e de pantomima, mas não com estimulação dolorosa. Cada membro é testado isoladamente, iniciando pelo braço não-parético. Somente em caso de amputação ou de fusão de articulação no ombro, o item deve ser considerado não-testável (NT), e uma explicação deve ser escrita para esta escolha.</p>	<p>0 = Sem queda; mantém o braço 90° (ou 45°) por 10 segundos completos. 1 = Queda; mantém o braço a 90° (ou 45°), porém este apresenta queda antes dos 10 segundos completos; não toca a cama ou outro suporte. 2 = Algum esforço contra a gravidade; o braço não atinge ou não mantém 90° (ou 45°), cai na cama, mas tem alguma força contra a gravidade. 3 = Nenhum esforço contra a gravidade; braço despenca. 4 = Nenhum movimento. NT = Amputação ou fusão articular, explique: _____</p> <p>5a. Braço esquerdo      5b. Braço direito</p>	<p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p>	<p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p>
<p><b>6. Motor para pernas</b> A perna é colocada na posição apropriada: extensão a 30° (sempre na posição supina). É valorizada queda do braço se esta ocorre antes de 5 segundos. O paciente afásico é encorajado através de firmeza na voz e de pantomima, mas não com estimulação dolorosa. Cada membro é testado isoladamente, iniciando pela perna não-parética. Somente em caso de amputação ou de fusão de articulação no quadril, o item deve ser considerado não-testável (NT), e uma explicação deve ser escrita para esta escolha.</p>	<p>0 = Sem queda; mantém a perna a 30° por 5 segundos completos. 1 = Queda; mantém a perna a 30°, porém esta apresenta queda antes dos 5 segundos completos; não toca a cama ou outro suporte. 2 = Algum esforço contra a gravidade; a perna não atinge ou não mantém 30°, cai na cama, mas tem alguma força contra a gravidade. 3 = Nenhum esforço contra a gravidade; perna despenca. 4 = Nenhum movimento. NT = Amputação ou fusão articular, explique: _____</p> <p>6a. Perna esquerda      6b. Perna direita</p>	<p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p>	<p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p>



Instrução	Definição da escala	Escore	Hora
<p><b>7. Ataxia de membros</b> Este item é avaliado se existe evidência de uma lesão cerebelar unilateral. Teste com os olhos abertos. Em caso de defeito visual, assegure-se que o teste é feito no campo visual intacto. Os testes index-nariz e calcanhar-joelho são realizados em ambos os lados e a ataxia é valorizada, somente, se for desproporcional à fraqueza. A ataxia é considerada ausente no paciente que não pode entender ou está hemiplégico. Somente em caso de amputação ou de fusão de articulações, o item deve ser considerado não-testável (NT), e uma explicação deve ser escrita para esta escolha. Em caso de cegueira, teste tocando o nariz, a partir de uma posição com os braços estendidos.</p>	<p>0 = Ausente. 1 = Presente em 1 membro. 2 = Presente em dois membros. NT = Amputação ou fusão articular, explique: _____</p>	<p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p>	<p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p>
<p><b>8. Sensibilidade</b> Avalie sensibilidade ou mímica facial ao beliscar ou retirada do estímulo doloroso em paciente torporoso ou afásico. Somente a perda de sensibilidade atribuída ao AVC é registrada como anormal e o examinador deve testar tantas áreas do corpo (braços [exceto mãos], pernas, tronco e face) quantas forem necessárias para checar acuradamente um perda hemisensitiva. Um escore de 2, "grave ou total" deve ser dado somente quando uma perda grave ou total da sensibilidade pode ser claramente demonstrada. Portanto, pacientes em estupor e afásicos irão receber provavelmente 1 ou 0. O paciente com AVC de tronco que tem perda de sensibilidade bilateral recebe 2. Se o paciente não responde e está quadriplégico, marque 2. Pacientes em coma (item 1a=3) recebem arbitrariamente 2 neste item.</p>	<p>0 = Normal; nenhuma perda. 1 = Perda sensitiva leve a moderada; a sensibilidade ao beliscar é menos aguda ou diminuída do lado afetado, ou há uma perda da dor superficial ao beliscar, mas o paciente está ciente de que está sendo tocado. 2 = Perda da sensibilidade grave ou total; o paciente não sente que está sendo tocado.</p>	<p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p>	<p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p>
<p><b>9. Melhor linguagem</b> Uma grande quantidade de informações acerca da compreensão pode obtida durante a aplicação dos itens precedentes do exame. O paciente é solicitado a descrever o que está acontecendo no quadro em anexo, a nomear os itens na lista de identificação anexa e a ler da lista de sentença anexa. A compreensão é julgada a partir destas respostas assim como das de todos os comandos no exame neurológico geral precedente. Se a perda visual interfere com os testes, peça ao paciente que identifique objetos colocados em sua mão, repita e produza falas. O paciente intubado deve ser incentivado a escrever. O paciente em coma (item 1A=3) receberá automaticamente 3 neste item. O examinador deve escolher um escore para pacientes em estupor ou pouco cooperativos, mas a pontuação 3 deve ser reservada ao paciente que está mudo e que não segue nenhum comando simples.</p>	<p>0 = Sem afasia; normal. 1 = Afasia leve a moderada; alguma perda óbvia da fluência ou dificuldade de compreensão, sem limitação significativa das idéias expressão ou forma de expressão. A redução do discurso e/ou compreensão, entretanto, dificultam ou impossibilitam a conversação sobre o material fornecido. Por exemplo, na conversa sobre o material fornecido, o examinador pode identificar figuras ou item da lista de nomeação a partir da resposta do paciente. 2 = Afasia grave; toda a comunicação é feita através de expressões fragmentadas; grande necessidade de interferência, questionamento e adivinhação por parte do ouvinte. A quantidade de informação que pode ser trocada é limitada; o ouvinte carrega o fardo da comunicação. O examinador não consegue identificar itens do material fornecido a partir da resposta do paciente. 3 = Mudo, afasia global; nenhuma fala útil ou compreensão auditiva.</p>	<p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p>	<p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p>



**Você sabe como fazer.**

**De volta pra casa.**

**Eu cheguei em casa do trabalho.**

**Próximo da mesa, na sala de jantar.**

**Eles ouviram o Pelé falar no rádio.**

**Mamãe**

**Tic-Tac**

**Paralelo**

**Obrigado**

**Estrada de ferro**

**Jogador de futebol**



Lista para nomeação no item 9. Melhor linguagem

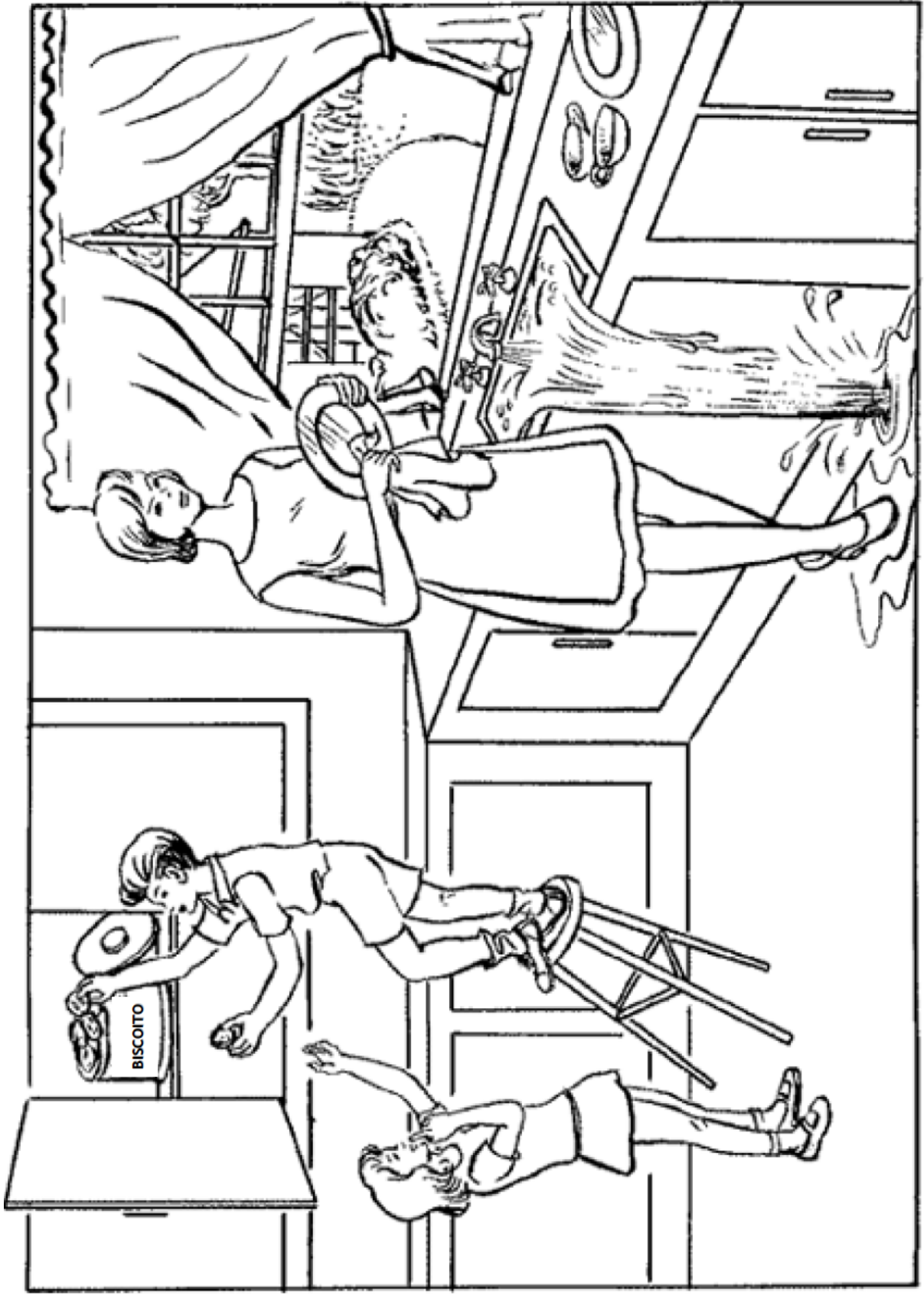


Figura para o item 9. Melhor linguagem

## 11.2 mRS - modified Rankin Scale

### ESCALA DE RANKIN

GRAU	DESCRIÇÃO
0	Sem sintomas
1	<b>Nenhuma incapacidade significativa</b> , a despeito dos sintomas; capaz de conduzir todos os deveres e atividades habituais
2	<b>Leve incapacidade</b> ; incapaz de realizar todas as atividades prévias, porém é independente para os cuidados pessoais
3	<b>Incapacidade moderada</b> ; requer alguma ajuda mas é capaz de caminhar sem assistência (pode usar bengala ou andador)
4	<b>Incapacidade moderadamente severa</b> ; incapaz de caminhar sem assistência e incapaz de atender às próprias necessidades fisiológicas sem assistência
5	<b>Deficiência grave</b> ; confinado à cama, incontinente, requerendo cuidados e atenção constante de enfermagem
6	<b>Óbito</b>

[http://pwwweb2.procempa.com.br/pmpa/prefpoa/redebrasilavc/usu\\_doc/rotinas\\_no\\_avc\\_abril\\_2009.pdf](http://pwwweb2.procempa.com.br/pmpa/prefpoa/redebrasilavc/usu_doc/rotinas_no_avc_abril_2009.pdf)

### 11.3 Termo de Consentimento

#### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

##### **Tema: Uso de biomarcadores sanguíneos como preditores de prognóstico em pacientes com acidente vascular cerebral agudo**

Convidamos você, ou seu familiar que é paciente nesse Hospital, a participar de um estudo sobre o uso de biomarcadores sanguíneos como preditores de prognóstico após um acidente vascular cerebral agudo, durante a internação hospitalar.

Nós queremos pesquisar a associação dos déficits clínicos e do estado funcional (ou seja, as possíveis sequelas, que serão analisadas através do exame neurológico clínico na admissão e na alta hospitalar), com os resultados dos exames realizados durante a internação, especificamente exames de neuroimagem (tomografia ou ressonância da cabeça) e exames de sangue (como interleucinas, TREM-1 e TREM-2 que são marcadores das alterações cerebrais que podemos identificar no sangue e podem estar associados a ocorrência de sequelas).

A coleta de sangue será realizada através de uma punção venosa que poderá causar algum desconforto, hematoma ou irritação local.

Essa é uma pesquisa científica que visa identificar mais precocemente por exames de sangue os pacientes com acidente vascular cerebral que apresentam maior risco de sequelas neurológicas graves. Todo o material coletado será armazenado sob um número código, garantindo o anonimato da pesquisa e os resultados obtidos terão unicamente interesse científico. Esse estudo não trará nenhum benefício direto para o seu tratamento, ou de seu familiar, nesse momento. No entanto, a pesquisa poderá ajudar a melhorar o tratamento do acidente vascular cerebral no futuro.

Entendi que a minha participação no estudo, ou do meu familiar com acidente vascular cerebral, é totalmente voluntária, sendo eu livre para recusar ou abandonar a pesquisa a qualquer momento, sem afetar ou por em risco meu futuro atendimento médico, ou do meu familiar. Todas as informações que eu precisar me serão fornecidas a qualquer momento, mesmo após o estudo. Terei ainda acesso aos



resultados finais dessa pesquisa.

Recebi uma via do presente termo e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer todas as dúvidas.

Paciente:

Responsável legal (quando for o caso):

Assinatura do paciente ou do responsável legal:

Médico pesquisador:

Assinatura do médico pesquisador:

Médico responsável: Dr. Marino Muxfeldt Bianchin

Em caso de dúvidas, podem ser contatados:

CTI Hospital de Clínicas: (51) 33598637 / (51) 33598639

Serviço de Neurologia do Hospital de Clínicas: (51) 33598182

Comitê de Ética em Pesquisa de 2ª a 6ª feiras das 8h às 17h: (51) 33597640 /  
(51) 33598340

## 11.4 Ficha de avaliação

### Uso de biomarcadores sanguíneos como preditores de prognóstico em pacientes com acidente vascular cerebral agudo

Data de inclusão: \_\_\_\_\_

Paciente: \_\_\_\_\_

Prontuário: \_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_

Gênero: ( ) Feminino ( ) Masculino

Raça: ( ) Branco ( ) Preto ( ) Mestiço

Tipo de AVC: ( ) Isquêmico ( ) Hemorrágico

Tempo de início dos sintomas: \_\_\_\_\_

AVC isquêmico - trombólise: ( ) Sim ( ) Não

Fatores de risco associados:

Hipertensão ( ) Cardiopatia isquêmica ( ) ACFA ( ) DM ( )

Obesidade ( ) Dislipidemia ( ) Tabagismo ( ) Etilismo ( )

Uso de contraceptivo oral ( ) Uso de anticoagulante ( )

Uso de drogas ilícitas ( )

Qual? \_\_\_\_\_

Doenças hematológicas ( )

Qual? \_\_\_\_\_

Neoplasia (tumor) ( )

Qual? \_\_\_\_\_

Outros: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

NIHSS na chegada: \_\_\_\_\_

NIHSS com 3 dias: \_\_\_\_\_

NIHSS com 5-7 dias: \_\_\_\_\_

NIHSS na alta hospitalar: \_\_\_\_\_

mRS na chegada: \_\_\_\_\_

mRS com 3 dias: \_\_\_\_\_

mRS com 5-7 dias: \_\_\_\_\_

mRS na alta hospitalar: \_\_\_\_\_

Exames da chegada:

Ht/Hb: \_\_\_\_\_

Leucócitos: \_\_\_\_\_

Plaquetas: \_\_\_\_\_

TP/RNI: \_\_\_\_\_

KTTP: \_\_\_\_\_

Sódio: \_\_\_\_\_

Potássio: \_\_\_\_\_

Uréia: \_\_\_\_\_

Cr: \_\_\_\_\_

Glicemia: \_\_\_\_\_

Demais exames laboratoriais relevantes: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

Ecocardiografia: \_\_\_\_\_

Ecografia de carótidas e vertebrais: \_\_\_\_\_

(Anexar cópias de laudos)

Exames de Neuroimagem:

1ª TC (data: \_\_\_\_\_): \_\_\_\_\_

2ª TC (data: \_\_\_\_\_): \_\_\_\_\_

3ª TC (data: \_\_\_\_\_): \_\_\_\_\_

RNM (data: \_\_\_\_\_): \_\_\_\_\_

EEG (data: \_\_\_\_\_): \_\_\_\_\_

(Anexar cópias de laudos)

## Dosagens Sanguíneas:

<b>Biomarcador</b>	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>
TREM-1			
TREM-2			
IL-23			
IL-17			

## 11.5 Ficha de reavaliação

### Uso de biomarcadores sanguíneos como preditores de prognóstico em pacientes com acidente vascular cerebral agudo

Caso n<sup>o</sup>: \_\_\_\_\_

Data do contato: \_\_\_\_\_

Paciente: \_\_\_\_\_

Prontuário: \_\_\_\_\_

Óbito:     não                       sim - Data: \_\_\_\_\_

Escala de Rankin modificada:     Rankin  $\leq$  3                       Rankin  $\geq$  4

	Grau	Descrição
<input type="checkbox"/>	0	<b>Assintomático</b>
<input type="checkbox"/>	1	<b>Nenhuma incapacidade significativa</b> , a despeito dos sintomas; capaz de conduzir todos os deveres e atividades habituais
<input type="checkbox"/>	2	<b>Leve incapacidade</b> ; incapaz de realizar todas as atividades prévias, porém é independente para os cuidados pessoais
<input type="checkbox"/>	3	<b>Incapacidade moderada</b> ; requer alguma ajuda mas é capaz de caminhar sem assistência (pode usar bengala ou andador)
<input type="checkbox"/>	4	<b>Incapacidade moderadamente severa</b> ; incapaz de caminhar sem assistência e incapaz de atender às próprias necessidades fisiológicas sem assistência
<input type="checkbox"/>	5	<b>Deficiência grave</b> ; confinado à cama, incontinente, requerendo cuidados e atenção constante de enfermagem
<input type="checkbox"/>	6	<b>Óbito</b>

Convulsões:    ( ) não            ( ) sim

- ( ) Confusão, mudança comportamental, irresponsividade
- ( ) Quedas repentinas
- ( ) Movimentos repetitivos
- ( ) Sonolência súbita
- ( ) Déficit neurológico focal temporário
- ( ) Afasia ou alteração de fala temporária
- ( ) Movimentos tônicos, clônicos ou tônico-clônicos rítmicos ou arrítmicos

Foram realizados exames:

- ( ) EEG
- ( ) Neuroimagem (TC ou RNM) – Qual? \_\_\_\_\_
- ( ) Exames laboratoriais – Quais? \_\_\_\_\_

Iniciado medicação para convulsões?    ( ) não            ( ) sim

Quais? \_\_\_\_\_

Novo AVC?    ( ) não            ( ) sim

Quando? \_\_\_\_\_

IAM após o AVC da inclusão?    ( ) não            ( ) sim

Quando? \_\_\_\_\_

Local de acompanhamento: \_\_\_\_\_

Questionário respondido por: \_\_\_\_\_