

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

Fabiane Neiva Backes

Porto Alegre
2015

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

Fabiane Neiva Backes

Orientador: Prof. Dr. Marino Muxfeldt Bianchin
Co-orientadora: Profa. Dra. Silvia Regina Rios Vieira

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

Porto Alegre
2015

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos Roberto de Mello Rieder

Prof. Dr. Cassiano Teixeira

Prof. Dr. Jorge Amilton Hoher

Prof. Dr. Wolnei Caumo

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 e dedicação.

Agradeço à Professora Silvia Regina Rios Vieira pela amizade e participação em minha busca pelo aperfeiçoamento profissional e pessoal.

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

Agradeço à médica intensivista Vanessa Oliveira pelas orientações e amizade.

Agradeço à enfermeira Cristini Klein pelas orientações e motivação.

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) é uma das principais causas de morte em todo o mundo e a maioria dos sobreviventes permanece com alguma sequela neurológica após o evento agudo. 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.

Material e Métodos: Incluímos nesse estudo 60 pacientes com AVC agudo admitidos na unidade neurovascular da emergência ou na unidade de medicina intensiva do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, nas primeiras 24 horas do início dos sintomas. Foram coletadas amostras sanguíneas nas primeiras 24 horas, no terceiro e no quinto dias após o AVC para dosagem de enolase neurônio específica (ENS), proteína S100 β (S100 β), interleucina 6 (IL-6), proteína C reativa (PCR) e fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF). A gravidade do AVC e o grau de dependência funcional dos pacientes após o AVC foram mensurados através das escalas do *National Institutes of Health Stroke Scale* (NIHSS) e *modified Rankin Scale* (mRS) nos três momentos das coletas sanguíneas e na alta hospitalar.

Resultados: Os níveis séricos de S100 β , IL-6 e PCR mostraram-se o melhor painel de biomarcadores após o AVC nesse estudo. Quando os pacientes foram subdivididos em dois grupos para a avaliação de desfechos neurológicos, usando as escalas do NIHSS (NIHSS \leq 6 e NIHSS $>$ 6) e mRS (mRS \leq 3 e mRS $>$ 3), ambas as escalas apresentaram boa associação entre as concentrações de S100 β e de IL-6 em todas as medidas e as escalas de AVC para bom prognóstico (NIHSS \leq 6 e mRS \leq 3) na alta hospitalar. Dentre os biomarcadores selecionados para o estudo, foram os três citados acima que apresentaram as melhores correlações com as escalas de AVC e com o prognóstico pós AVC durante o tempo de acompanhamento.

Conclusão: Os biomarcadores séricos podem ser úteis na avaliação da gravidade e do prognóstico após o AVC. A associação de S100 β , IL-6 e PCR parece acrescentar pouco às escalas validadas de AVC na capacidade de prever desfechos após o evento agudo.

Palavras-chave: *cerebral stroke, blood biomarkers, outcome, neuron-specific enolase, S100 β protein, interleukin-6, C-reactive protein, brain-derived neurotrophic factor.*

ABSTRACT

Background and Purpose: Stroke is an important cause of death worldwide, and the majority of stroke survivors suffer from some form of residual disability. 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.

Design and Methods: We investigated 60 patients with acute stroke who were admitted within 24 h of event onset at the intensive care unit or neurovascular emergency unit of Clínicas Hospital. All patients provided venous blood samples for the measurement of neuron-specific enolase (NSE), S100 β protein (S100 β), interleukin-6 (IL-6), C-reactive protein (CRP) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) within 24 h of the acute event, on the third day and on the fifth day 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 of blood collection and at the time of hospital discharge.

Results: The serum levels of the S100 β protein, IL-6 and CRP seem to constitute the best panel of biomarkers after acute stroke in this study. When patients were subdivided into two groups according to the NIHSS (NIHSS \leq 6 and NIHSS $>$ 6) and mRS (mRS \leq 3 and mRS $>$ 3) scores, which were used as neurological outcome measures, both neurologic scores for good outcome (NIHSS \leq 6 and mRS \leq 3) at hospital discharge were significantly related to the S100 β protein and IL-6 levels at all of the measured time points. Among the analyzed blood markers, S100 β , IL-6 and PCR levels significantly correlated with the stroke scales and prognostic value.

Conclusion: Blood biomarkers may be useful in acute stroke either by suggesting stroke severity or providing a prognostic value. The addition of the S100 β protein, IL-6 and CRP to previously validated stroke scales slightly improves the ability of these scales to predict outcome.

Keywords: cerebral stroke, blood biomarkers, outcome, neuron-specific enolase, S100 β protein, interleukin-6, C-reactive protein, brain-derived neurotrophic factor.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS DA DISSERTAÇÃO

Figuras

| | | | |
|-----------|---|-------|-----|
| Figura 1: | Estratégia de busca de referências bibliográficas | | 15. |
| Figura 2: | Gráfico de Box-plot representando os valores dos biomarcadores entre os paciente com AVC isquêmico ou hemorrágico ao longo do período de observação | | 69. |

Tabelas

| | | | |
|-----------|---|-------|-----|
| Tabela 1: | Matriz de correlação entre os biomarcadores séricos e as escalas de gravidade NIHSS e mRS do acidente vascular cerebral | | 61. |
| Tabela 2: | Matriz de correlação entre os biomarcadores séricos e as escalas de gravidade NIHSS e mRS do acidente vascular cerebral na alta hospitalar | | 62. |
| Tabela 3: | Valores para a área da curva ROC dos biomarcadores séricos na predição de bom desfecho pelas escalas de gravidade NIHSS e mRS do acidente vascular cerebral | | 63. |
| Tabela 4: | Comparação dos valores dos biomarcadores séricos entre os pacientes com NIHSS ≤ 6 vs NIHSS > 6 | | 64. |
| Tabela 5: | Comparação dos valores dos biomarcadores séricos entre os pacientes com mRS ≤ 3 vs mRS > 3 | | 65. |
| Tabela 6: | Matriz de correlação entre os biomarcadores séricos e o tempo de internação hospitalar | | 66. |
| Tabela 7: | Comparação dos valores dos biomarcadores séricos entre os pacientes com AVC isquêmico vs AVC hemorrágico | | 67. |
| Tabela 8: | Matriz de correlação entre os biomarcadores séricos e as escalas de gravidade NIHSS e mRS do acidente vascular cerebral (AVC) estratificada por tipo de AVC | | 68. |

LISTA DE TABELAS E FIGURA DO ARTIGO

Tabelas

| | | | |
|-----------|---|-------|-----|
| Table 1: | Baseline characteristics of the study population | | 49. |
| Table 2: | Blood biomarkers according to moments of observation | | 50. |
| Table 3: | Correlation matrix between biomarkers and stroke scales NIHSS and mRS | | 50. |
| Table 4: | Correlation matrix between biomarkers and stroke scales NIHSS and mRS at discharge | | 51. |
| Table 5: | Values for area under the ROC curve of serum biomarkers in predicting good outcome of stroke scales NIHSS and mRS | | 52. |
| Table 6: | Comparison of the values of serum biomarkers between patients with NIHSS ≤ 6 vs NIHSS > 6 | | 53. |
| Table 7: | Comparison of the values of serum biomarkers between patients with mRS ≤ 3 vs mRS > 3 | | 54. |
| Table 8: | Correlation matrix between biomarkers and length of hospital stay | | 55. |
| Table 9: | Comparison of the values of serum biomarkers between patients with ischemic stroke vs hemorrhagic stroke | | 56. |
| Table 10: | Correlation matrix between biomarkers and stroke scales NIHSS and mRS subdivided by stroke type | | 57. |

Figura

| | | | |
|-----------|---|-------|-----|
| Figure 1: | Serum levels of biomarkers for patients with ischemic or hemorrhagic stroke throughout the observational period | | 58. |
|-----------|---|-------|-----|

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AUC: *area under the curve*

AVC: acidente vascular cerebral

BDNF: fator neurotrófico derivado do cérebro; *brain-derived neurotrophic factor*

CAAE: Certificado de apresentação para apreciação ética

CEP-HCPA: Comitê de Ética em Pesquisa – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

CRP: *C-reactive protein*

CT: *computerized tomography*

ENS: enolase neurônio específica

GEE: *generalized estimating equations*

IL-6: interleucina-6; *interleukin-6*

MRI: *magnetic resonance imaging*

mRS: *modified Rankin Scale*

NIHSS: *National Institutes of Health Stroke Scale*

NSE: *neuron-specific enolase*

PCR: proteína C reativa

RNM: ressonância nuclear magnética

ROC: *Receiver Operating Characteristics*

SD: *standard deviations*

S100 β : proteína S100 β ; *S100 β protein*

TC: tomografia computadorizada

vs: *versus*

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 13 |
| 2. REVISÃO DA LITERATURA | 14 |
| 2.1 Estratégias para localizar e selecionar as informações | 14 |
| 2.2 Considerações gerais | 17 |
| 2.3 Biomarcadores..... | 19 |
| 2.4 Escalas de AVC..... | 23 |
| 3. MARCO TEÓRICO | 24 |
| 4. JUSTIFICATIVA..... | 25 |
| 5. OBJETIVOS..... | 26 |
| 5.1 Objetivo primário | 26 |
| 5.2 Objetivos secundários | 26 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 28 |
| 7. ARTIGO | 33 |
| 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 59 |
| 9. PERSPECTIVAS FUTURAS | 72 |
| 10. ANEXOS | 73 |
| 10.1 NIHSS - <i>National Institutes of Health Stroke Scale</i> | 73 |
| 10.2 mRS - <i>modified Rankin Scale</i>..... | 81 |
| 10.3 Termo de Consentimento | 82 |

1. INTRODUÇÃO

O acidente vascular cerebral (AVC) é uma das principais causas de morte, variando de primeira à quarta conforme a idade, o sexo, a etnia e os fatores de risco, e a maior causa de morbidade no mundo^{1, 2}. A avaliação dos pacientes com AVC através do uso de escalas é importante na rotina clínica e em pesquisas, pois homogeneiza as apreciações clínicas, aumenta a acurácia diagnóstica, ajuda na escolha de tratamentos específicos, permite a identificação de déficits neurológicos e da evolução destes déficits durante o tempo de acompanhamento, bem como auxilia na predição dos desfechos^{3, 4}. A identificação de biomarcadores para o AVC objetiva compreender melhor a fisiopatologia da doença cerebrovascular, otimizar o diagnóstico, auxiliar na determinação do tipo e do mecanismo do AVC, e, principalmente, prever a evolução neurológica e a resposta ao tratamento².

O AVC é uma doença heterogênea com localização, tamanho e mecanismos diferentes⁵. É importante a identificação de biomarcadores sensíveis e específicos de dano e de evolução neurológica que atravessem a barreira hematoencefálica e que possam ser coletados no sangue, visto que as coletas líquóricas são mais difíceis, apresentam mais riscos e contra-indicações, como o aumento da pressão intracraniana⁶. Um biomarcador isolado pode não ser suficiente para fornecer as informações desejadas em relação a uma doença tão complexa, como já demonstrado em estudos prévios⁵. Portanto, busca-se a identificação de grupos de marcadores 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, as isquemias cerebrais primária e secundária^{5, 7}.

Nesse estudo procuramos correlacionar biomarcadores séricos envolvidos em diferentes processos da fisiopatologia do AVC com a severidade e o prognóstico dos pacientes durante a internação hospitalar. Foram escolhidos os seguintes biomarcadores: enolase neurônio específica (ENS), proteína S100 β (S100 β),

interleucina-6 (IL-6), proteína C reativa (PCR) e fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF). 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*).

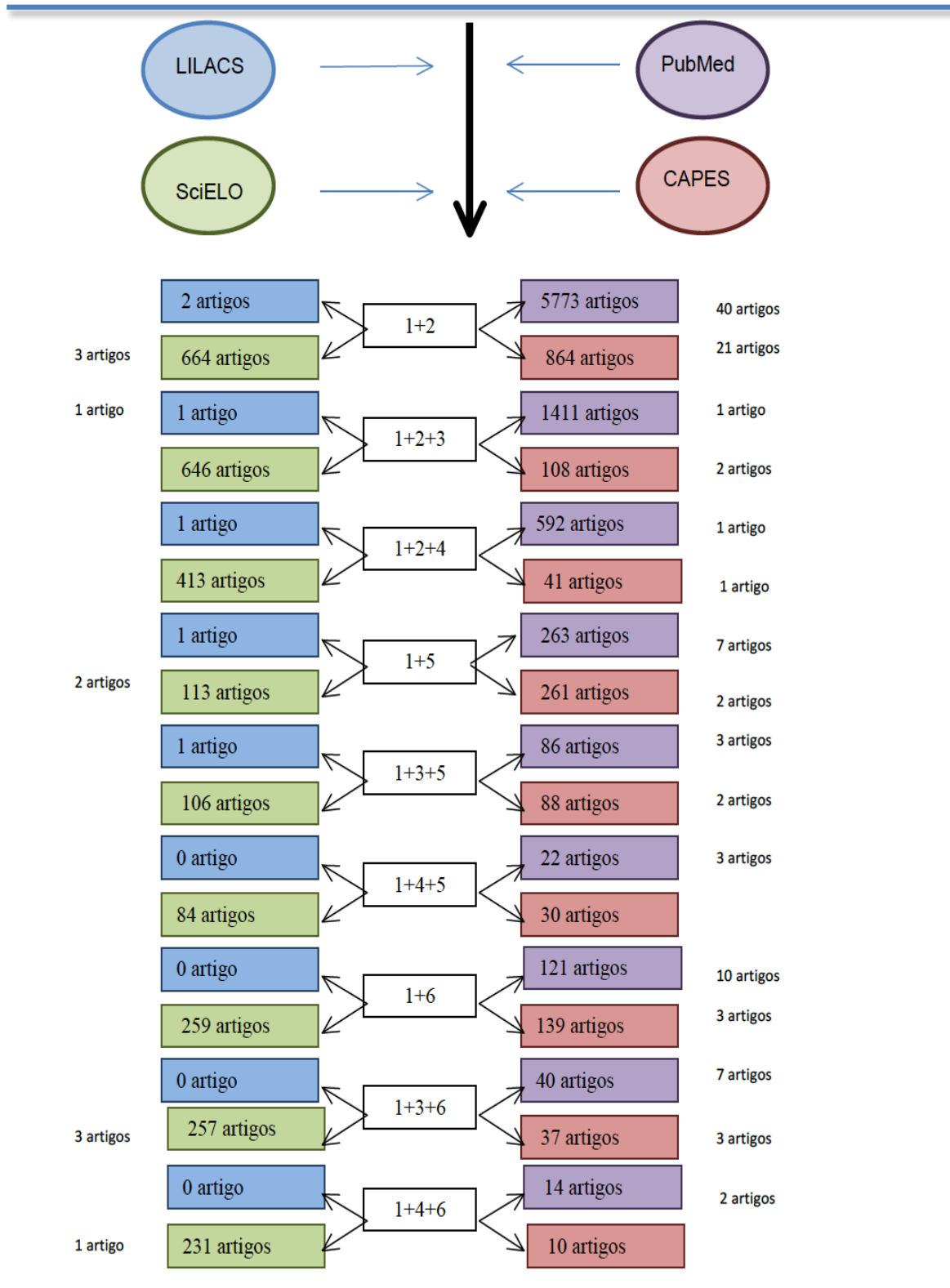
2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Estratégias para localizar e selecionar as informações

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

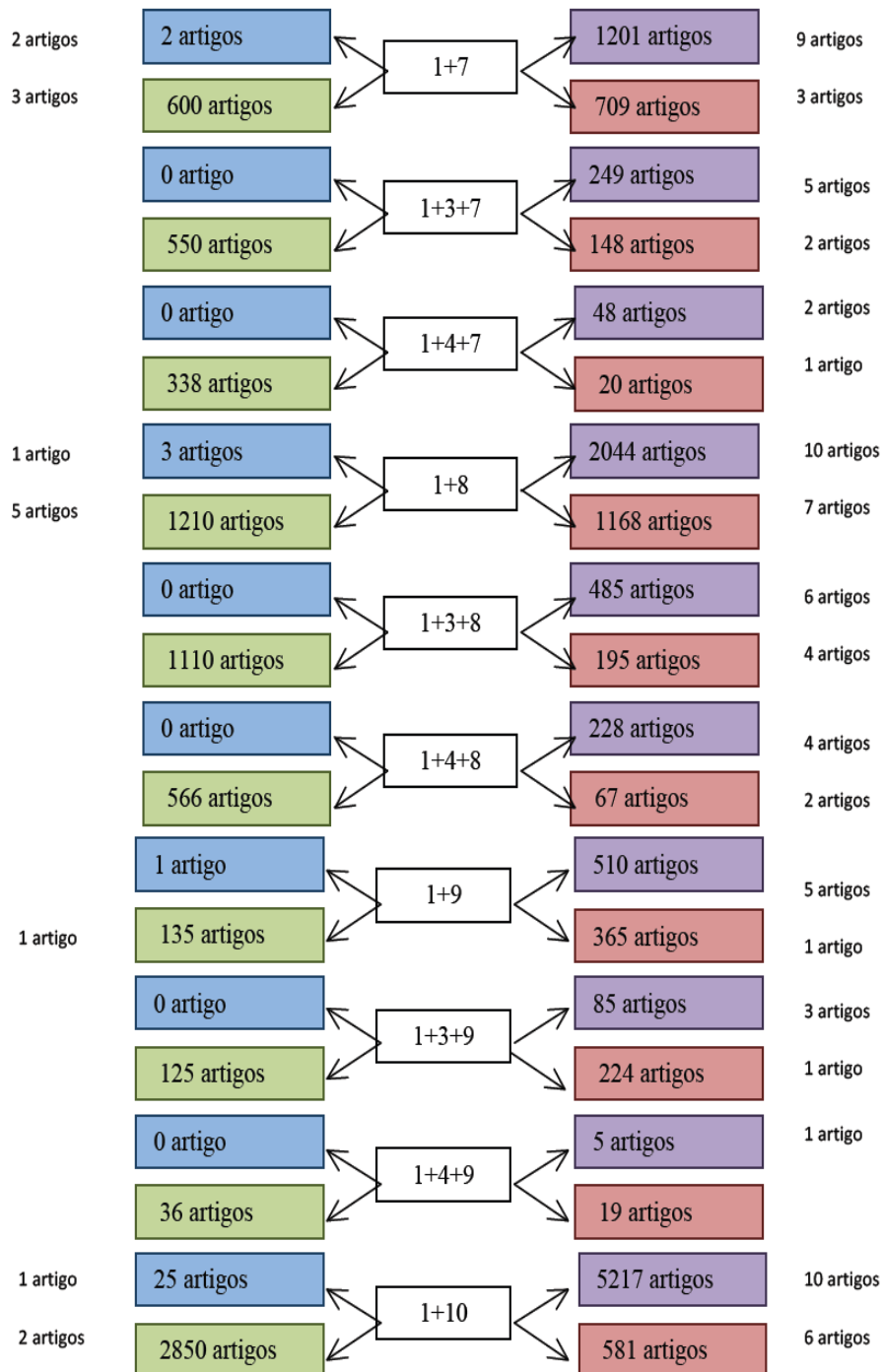
A revisão da literatura para esse trabalho foi focada no uso e na importância de biomarcadores séricos como preditores de prognóstico em pacientes neurológicos após AVC. A estratégia de busca envolveu quatro bases de dados: *PubMed*, *LILACS*, *CAPES* e *SciELO*, no período de 1987 a 2015. Os descritores usados foram: (1) *cerebral stroke*, (2) *blood biomarkers*, (3) *outcome*, (4) *prognostic*, (5) *neuron-specific enolase*, (6) *S100 β protein*, (7) *interleukin-6*, (8) *C-reactive protein*, (9) *brain-derived neurotrophic factor*, (10) *stroke scales*.

Figura 1: Estratégia de Busca de Referências Bibliográficas

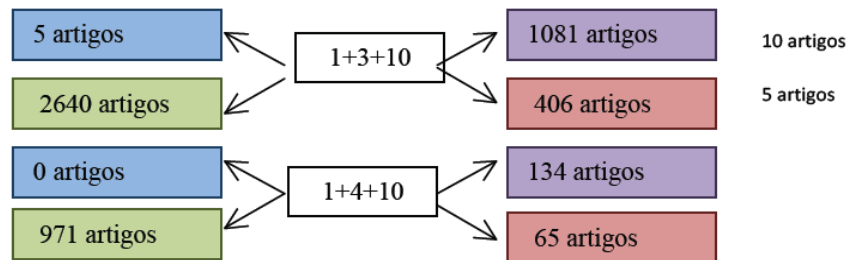


Em cada box central, os números indicados correspondem aos descritores de fator de estudo: (1) *cerebral stroke*, (2) *blood biomarkers*, (3) *outcome*, (4) *prognostic*, (5) *neuron specific enolase*, (6) *S100β protein*, (7) *interleukin-6*, (8) *C-reactive protein*, (9) *brain derived neurotrophic factor*, (10) *stroke scales*. Nas colunas mais laterais estão descritos quantos artigos foram selecionados em cada busca para leitura e análise na íntegra do manuscrito.

Figura 1: Estratégia de Busca de Referências Bibliográficas (continuação)



Em cada box central, os números indicados correspondem aos descritores de fator de estudo: (1) *cerebral stroke*, (2) *blood biomarkers*, (3) *outcome*, (4) *prognostic*, (5) *neuron specific enolase*, (6) *S100 β protein*, (7) *interleukin-6*, (8) *C-reactive protein*, (9) *brain derived neurotrophic factor*, (10) *stroke scales*. Nas colunas mais laterais estão descritos quantos artigos foram selecionados em cada busca para leitura e análise na íntegra do manuscrito.

Figura 1: Estratégia de Busca de Referências Bibliográficas (*continuação*)

Em cada box central, os números indicados correspondem aos descritores de fator de estudo: (1) *cerebral stroke*, (2) *blood biomarkers*, (3) *outcome*, (4) *prognostic*, (5) *neuron specific enolase*, (6) *S100 β protein*, (7) *interleukin-6*, (8) *C-reactive protein*, (9) *brain derived neurotrophic factor*, (10) *stroke scales*. Nas colunas mais laterais estão descritos quantos artigos foram selecionados em cada busca para leitura e análise na íntegra do manuscrito.

2.2 Considerações gerais

As doenças cerebrovasculares, incluindo o AVC isquêmico e o AVC hemorrágico, apresentam altas taxas de mortalidade e de morbidade. 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^{1,8}.

O AVC é definido como um déficit neurológico de início abrupto atribuído a uma causa vascular focal. O diagnóstico é clínico, mas os exames complementares de imagem e laboratoriais corroboram para a confirmação diagnóstica precisa. As manifestações clínicas dessa doença são muito variáveis, devido à complexa anatomia vascular cerebral. A isquemia cerebral é causada pela redução do fluxo sanguíneo cerebral, mesmo que por curto período de tempo (segundos), levando a infarto e à morte neuronal^{1,8,9}.

O AVC isquêmico é definido pela persistência dos sinais e dos sintomas por pelo menos 24 horas ou infarto cerebral demonstrado por exame de imagem, sendo as causas mais comuns a aterotrombótica e a embólica. 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. Além disso, 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^{8,9}.

O AVC hemorrágico é causado pelo sangramento direto de vasos intracerebrais ou em torno do cérebro e os sintomas ocorrem por compressão direta das estruturas cerebrais (efeito de massa), efeitos tóxicos do sangue ou aumento de pressão intracraniana. A hipertensão é a causa mais importante e prevalente dentre os fatores de risco para esse tipo de AVC, levando a uma vasculopatia denominada hipo-hialinose e resultando na ruptura espontânea de pequenos vasos. A angiopatia amilóide cerebral, caracterizada pela deposição de proteína β -amilóide em vasos de pequeno e médio calibre do cérebro e das leptomeninges com consequente necrose fibrinóide, usualmente assintomática, é outro importante fator de risco em paciente idosos^{8,9}.

Os exames de imagem cerebral, incluindo TC (tomografia computadorizada), RNM (ressonância nuclear magnética), angiografia, técnicas de ultrassonografia (como doppler transcraniano e “duplex”) e técnicas de perfusão (como tomografia com xenônio e tomografia com emissão de pósitrons), auxiliam no diagnóstico, no tratamento e na avaliação prognóstica^{1,5,8,9}. A busca de biomarcadores que possam ser usados com essas finalidades no AVC e que apresentem boa correlação com as escalas prognósticas usadas na prática clínica podem auxiliar no atendimento dos pacientes com AVC, aumentando a sensibilidade, a especificidade e reduzindo os custos. No entanto, os trabalhos publicados até o momento apresentam resultados conflitantes^{2,5,6,7,10,11}.

2.3 Biomarcadores

Há uma utilização crescente do uso de biomarcadores em doenças vasculares. O biomarcador ideal deve ser confiável, rapidamente mensurável e prontamente disponível, além de auxiliar no diagnóstico, na determinação da fisiopatologia, na predição da resposta ao tratamento e dos desfechos clínicos^{5, 12}.

Apesar de vários trabalhos de pesquisa, ainda não foi encontrado um bom biomarcador para o AVC, assim como a troponina para a cardiopatia isquêmica ou a creatinina para a insuficiência renal⁵. As razões para isso parecem estar relacionadas à heterogeneidade do AVC, incluindo as causas, o tamanho da área comprometida, a localização e os fatores de risco. A barreira hematoencefálica também pode prejudicar a liberação de biomarcadores cerebrais específicos e os mesmos não estão associados a um único tipo de injúria cerebral, podendo ser encontrados no AVC isquêmico, no AVC hemorrágico, na hemorragia subaracnóide e no traumatismo cranioencefálico^{5, 13}. 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, 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^{5, 7, 13, 14}. Do ponto de vista clínico, prefere-se a dosagem de marcadores séricos comparados aos líquorídios pela facilidade das coletas, a possibilidade de coletas seriadas e o menor risco de complicações⁶. Por isso, os biomarcadores selecionados devem apresentar concentrações plasmáticas representativas do dano neurológico após o comprometimento da barreira hematoencefálica e associação com os desfechos clínicos neurológicos¹⁵. Para esse trabalho foram selecionados os seguintes biomarcadores séricos, baseados em estudos prévios, que serão discutidos abaixo: enolase neurônio específica (ENS), proteína S100β (S100β), interleucina-6 (IL-6), proteína C reativa (PCR) e fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF).

A enolase neurônio específica (ENS) é a forma neuronal da enzima glicolítica enolase. Ela pode ser encontrada principalmente no citoplasma de

neurônios e em células de origem neuroendócrina, mas também, e em menor quantidade, em eritrócitos e em plaquetas. Está sempre presente em pequena quantidade no líquido e no sangue^{6, 16}. Foram demonstradas concentrações líquóricas e séricas elevadas em várias doenças neurológicas e boa correspondência com os desfechos neurológicos em traumatismo cranioencefálico e em encefalopatia hipóxico-isquêmica⁶. Uma revisão sistemática de 12 estudos concluiu que a ENS tem valor limitado para o diagnóstico de AVC isquêmico, apesar dos níveis séricos elevados nesses pacientes comparados a controles, mas apresenta boa correlação com o tamanho da área isquêmica e o grau de déficit neurológico¹⁷. Concentrações séricas elevadas estão associadas a pior prognóstico a curto prazo em pacientes com AVC agudo (isquêmico e hemorrágico) e apresentam boa correlação com o escore do NIHSS¹⁸.

A proteína glial S100 β (S100 β) pertence a família das proteínas ligadas ao cálcio e pode ser encontrada como homo ou hetero dímeros de duas subunidades diferentes (alfa e beta). Diferentes combinações das subunidades formam os heterodímeros alfa-alfa, alfa-beta e beta-beta; os tipos alfa-beta e beta-beta são descritos como a proteína S100 β e são altamente específicas do tecido nervoso. Quando ocorre um dano estrutural, como um infarto, nas células de Schwann ou gliais, a proteína S100 β é liberada no líquido e no sangue. Essa proteína é um marcador de disfunção da barreira hematoencefálica, sua concentração no líquido é aproximadamente 40 vezes maior que no plasma, não é afetada por hemólise e permanece estável por algumas horas, portanto sem necessidade de análise imediata^{16, 19}. Vários estudos, incluindo uma revisão sistemática publicada em 2009, mostraram que ocorre um aumento significativo da S100 β após o AVC isquêmico agudo e há correlação destes valores com o volume de área infartada, a gravidade do AVC e os desfechos funcionais; além disso, ela é um possível marcador de evolução da isquemia^{10, 19, 20, 21}. Também foi demonstrada uma boa correlação entre os níveis de S100 β e os escores do NIHSS, Rankin e Barthel na admissão, na alta hospitalar e no acompanhamento por até 6 meses^{16, 22}. Na fase mais aguda do AVC isquêmico de artéria cerebral média (primeiras 6 horas até 7 dias), os níveis séricos da S100 β podem prever a evolução maligna, definida como sinais de herniação cerebral, e apresentam boa correlação com os exames de imagem, auxiliando no tratamento e na definição da necessidade de realização de hemicraniectomia

descompressiva²³. Em pacientes com AVC hemorrágico os níveis médios mais elevados de S100 β estão associados a deteriorização neurológica precoce, definida como o aumento de 4 pontos ou mais no escore de NIHSS nas primeiras 48 horas, desfechos desfavoráveis em 3 meses (mRS maior que 2) e se correlacionam com o volume inicial do hematoma^{18, 24}.

São crescentes as evidências de que a resposta inflamatória tem um papel importante na patogênese do dano neurológico que ocorre após o AVC. Citoquinas pró-inflamatórias, como a interleucina 6 (IL-6), são secretadas na região afetada por leucócitos, astrócitos, células microgliais e células endoteliais pela ativação das células imunes que dirigem o processo inflamatório e induzem a liberação de outras moléculas inflamatórias. Vários estudos mostram um aumento das citoquinas pró-inflamatórias no líquido e no sangue na fase aguda do AVC. O mecanismo de liberação das citoquinas ainda não está bem claro, acreditando-se que seja mediado pela ativação do sistema nervoso simpático e das catecolaminas, visto que as concentrações plasmáticas de catecolaminas também estão elevadas após infarto e sangramento cerebrais. Além disso, a produção local de citoquinas pró-inflamatórias no cérebro e a irritação direta do tronco cerebral podem ativar o sistema simpático e liberar catecolaminas que levam à secreção sistêmica das citoquinas pró-inflamatórias^{11, 25}. Os resultados dos trabalhos publicados até o momento mostram resultados conflitantes em relação à correlação dos níveis séricos de IL-6 com a severidade do AVC, os desfechos clínicos neurológicos, a recorrência de eventos isquêmicos cerebrais e morte^{11, 25, 26, 27, 28}. Uma revisão sistemática publicada em 2009 evidenciou associação de níveis elevados de marcadores inflamatórios com piores desfechos pós AVC, mas não mostrou aumento do valor preditivo quando a IL-6 foi acrescentada aos modelos prognósticos validados para AVC, como mRS²⁹. Outra revisão e metanálise publicada em 2014 corrobora esses resultados e sugere uma possível associação da IL-6 com complicações infecciosas pós AVC³⁰.

A proteína C reativa (PCR) é um reagente de fase aguda predominantemente produzido pelo fígado e regulado pelas citoquinas inflamatórias. No entanto, ela se expressa nas células musculares lisas das artérias com doença aterosclerótica e está envolvida em múltiplos aspectos da fisiopatologia das placas vulneráveis. Em função disto, concentrações elevadas de PCR estão associadas ao aumento do risco de doenças cerebrovasculares³¹. Estudos experimentais com

modelos animais de isquemia focal mostraram que níveis elevados de PCR aumentam o dano cerebral secundário pela ativação do sistema de complemento³². Vários estudos em humanos sugerem uma associação entre os valores de PCR na fase aguda do AVC com mortalidade, prognóstico neurológico, incidência de novos eventos cerebrovasculares e cardiovasculares, tamanho e tipo de AVC^{33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40}. Nos pacientes submetidos a coletas seriadas de PCR, houve melhor correlação do prognóstico com as dosagens realizadas em torno de 24 horas após o evento isquêmico^{34, 35, 39}. O uso das dosagens de PCR na fase subaguda do AVC como preditor de novos eventos isquêmicos, no *follow-up* de pacientes em tratamento preventivo secundário (com estatinas e antiagregantes plaquetários), também mostrou resultados significativos, ao passo que a dupla antiagregação plaquetária não apresentou efeito protetor na amostra estudada⁴¹.

O fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) é uma neurotrofina envolvida na neurogênese, na angiogênese e na sobrevivência neuronal. Manifesta-se precocemente no desenvolvimento neuronal com funções de reparo e de plasticidade. Estudos experimentais sugerem que os neurônios e as células gliais agem como fontes endógenas de BDNF após isquemia e outras injúrias cerebrais. O BDNF causa vasodilatação por aumento da síntese de prostaciclina, protegendo contra a vasoconstrição relacionada à lesão e à formação de trombos na parede do vaso cerebral. Portanto, o BDNF pode reduzir os riscos do AVC pelos seus efeitos neurotróficos e vasculares^{42, 43, 44}. O BDNF pode atravessar a barreira hematoencefálica principalmente quando há quebra da integridade da barreira por alguma condição patológica, como a isquemia. Assim, os níveis séricos podem refletir os níveis cerebrais de BDNF. Estudos sugerem que baixos níveis séricos de BDNF estão associados a aumento do risco de AVC^{44, 45}. Além disso, foram encontradas baixas concentrações séricas de BDNF nos pacientes que já apresentam fatores de risco conhecidos, como cardiopatia isquêmica, diabetes tipo 2, síndrome metabólica e sedentarismo⁴². Concentrações mais elevadas de BDNF pós AVC isquêmico correlacionam-se ainda com menor manifestação de sintomas depressivos e melhor memória visual na fase aguda^{42, 44, 46}. No entanto, não foram demonstradas correlações, no mesmo período, entre os níveis desse marcador, o tamanho do infarto em exame de imagem e os escores de NIHSS e *Barthel Index*⁴⁶.

2.4 Escalas de AVC

O uso de escalas para AVC tem importância fundamental na clínica e em pesquisas, pois homogeneiza a avaliação clínica, aumenta a acurácia diagnóstica, permite a monitorização dos déficits neurológicos, auxilia na adequação e na escolha de tratamentos específicos, permite mensurar e prever os desfechos. Além disso, facilita a comunicação entre clínicos e pesquisadores^{3, 4}.

Há várias escalas confiáveis e validadas, mas nenhuma é capaz de avaliar todos os aspectos clínicos ou relacionados às pesquisas. Portanto, as escalas procuram priorizar uma de três dimensões do impacto da doença, que incluem: 1- a dimensão corporal, que se refere à estrutura e à função dos sistemas corporais (ex.: perda de força, perda de sensibilidade, hemianopsia, disartria); 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 um dos outros domínios⁴⁷.

No presente estudo, optamos pelo uso das escalas do NIHSS e mRS para avaliação da correlação com os biomarcadores selecionados, pois são amplamente utilizadas na prática clínica e permitem a mensuração de dois dos domínios citados. Essas escalas estão apresentadas no final da dissertação.

A escala do NIHSS é uma escala padrão validada para o uso em "*clinical trials*" e para prática clínica, mensura as perdas neurológicas através de 15 itens de avaliação (pontuação de 0 à 42). Esse escore é útil na avaliação da severidade dos déficits neurológicos, auxilia na definição e na escolha de tratamentos, bem como na predição de desfechos a curto e a longo prazos. No entanto, apresenta limitações na avaliação de pacientes com isquemia em território cerebral vertebrobasilar^{4, 48, 49, 50}.

A escala mRS mensura a independência funcional pós AVC, sendo amplamente usada para avaliação global do impacto do AVC em estudos científicos

e em intervenções clínicas. Além disso, apresenta boa correlação com o volume cerebral infartado e outros escores^{51, 52, 53}.

No entanto, é importante mencionar que todas as escalas apresentam limitações, então sujeitas a variações intra e interobservadores, apresentam diferentes propósitos e associações com o tempo de observação dos pacientes avaliados^{50, 54}.

3. MARCO TEÓRICO

A partir da década de 90 houve um interesse crescente no uso de biomarcadores em pacientes após AVC para investigação, monitorização do *status* neurológico e predição de desfechos a curto e a longo prazos^{2, 5, 7, 15}.

O exame clínico neurológico ainda é considerado o padrão ouro nos pacientes que apresentam o sensório parcialmente preservado. No entanto, essa forma de avaliação encontra-se prejudicada nos pacientes com lesões neurológicas mais severas, que estão comatosos ou necessitam de sedação, sendo necessária a realização de exames de imagem, laboratoriais e, na fase aguda, monitorização neurológica multimodal conforme a gravidade do caso^{9, 48}. 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, melhorando a capacidade de predição dos desfechos^{5, 7, 29}.

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^{2, 5, 7}.

4. JUSTIFICATIVA

O acidente vascular cerebral (AVC) é uma das principais causas de morte e de sequelas neurológicas no mundo. A mortalidade nos primeiros 30 dias após AVC isquêmico é de aproximadamente 10%, sendo principalmente relacionada à sequela neurológica, podendo chegar à 40% ao final do primeiro ano^{1, 55}. A maioria dos pacientes que sobrevivem à fase aguda do AVC apresentam déficits neurológicos que necessitam de reabilitação, sendo que aproximadamente 70% não retornarão ao trabalho e 30% necessitarão de auxílio para caminhar⁹. Os custos do tratamento destes pacientes são elevados^{1, 9, 55}.

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 mRS, as quais podem auxiliar também na predição dos desfechos neurológicos^{3, 4}. No entanto, apesar de validadas e amplamente usadas clínica e cientificamente, essas escalas apresentam variação de confiabilidade interobservadores^{48, 51, 53}. Portanto, busca-se um painel de biomarcadores séricos que apresente boa correlação com as escalas já usadas e que possa aumentar a capacidade de prever a evolução neurológica dos pacientes após um AVC^{5, 7}.

A identificação de um painel de biomarcadores que preencha esses objetivos auxiliará no tratamento, 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 ENS, proteína S100 β , IL-6, PCR e BDNF, 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.
- 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.
- Verificar se existe diferença das dosagens dos biomarcadores entre os pacientes que apresentam AVC isquêmico e AVC hemorrágico.

- Verificar se as correlações entre os biomarcadores e os desfechos neurológicos possuem magnitudes diferentes entre os tipos de AVC (isquêmico e hemorrágico).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M, et al; American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics--2015 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2015 Jan 27; 131(4): e29-322.
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): 230-40.
3. Asplund K. Clinimetrics in stroke research. *Stroke*. 1987 Mar-Apr; 18(2): 528-30.
4. 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): 2182-7.
5. Jickling GC, Sharp FR. Biomarker panels in ischemic stroke. *Stroke*. 2015 Mar; 46(3): 915-20.
6. Schaarschmidt H, Prange HW, Reiber H. Neuron-specific enolase concentrations in blood as a prognostic parameter in cerebrovascular diseases. *Stroke*. 1994 Mar; 25(3): 558-65.
7. Whiteley W, Chong WL, Sengupta A, Sandercock P. Blood markers for the prognosis of ischemic stroke: a systematic review. *Stroke*. 2009 May; 40(5): e380-9.
8. Kasper D, Fauci F, Hauser S, Longo D, Jameson J, Loscalzo J. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 19th ed. McGraw-Hill; 2015.
9. Lee K. *The NeuroICU Book*. New York, US: McGraw-Hill; 2012.
10. Missler U, Wiesmann M, Friedrich C, Kaps M. S-100 protein and neuron-specific enolase concentrations in blood as indicators of infarction volume and prognosis in acute ischemic stroke. *Stroke*. 1997 Oct; 28(10): 1956-60.
11. Oto J, Suzue A, Inui D, Fukuta Y, Hosotsubo K, Torii M, et al. Plasma proinflammatory and anti-inflammatory cytokine and catecholamine concentrations as predictors of neurological outcome in acute stroke patients. *J Anesth*. 2008; 22(3): 207-12.
12. 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 5; 119(17): 2408-16.

13. 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.
14. 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): 710-5.
15. Reynolds MA, Kirchick HJ, Dahlen JR, Anderberg JM, McPherson PH, Nakamura KK, et al. Early biomarkers of stroke. *Clin Chem*. 2003 Oct; 49(10): 1733-9.
16. Kaca-Oryńska M, Tomasiuk R, Friedman A. Neuron-specific enolase and S 100B protein as predictors of outcome in ischaemic stroke. *Neurol Neurochir Pol*. 2010 Sep-Oct; 44(5): 459-63.
17. Anand N, Stead LG. Neuron-specific enolase as a marker for acute ischemic stroke: a systematic review. *Cerebrovasc Dis*. 2005; 20(4): 213-9.
18. Brea D, Sobrino T, Blanco M, Cristobo I, Rodríguez-González R, Rodríguez-Yañez M, et al. Temporal profile and clinical significance of serum neuron-specific enolase and S100 in ischemic and hemorrhagic stroke. *Clin Chem Lab Med*. 2009; 47(12): 1513-8.
19. Nash DL, Bellolio MF, Stead LG. S100 as a marker of acute brain ischemia: a systematic review. *Neurocrit Care*. 2008; 8(2): 301-7.
20. Wunderlich MT, Lins H, Skalej M, Wallesch CW, Goertler M. Neuron-specific enolase and tau protein as neurobiochemical markers of neuronal damage are related to early clinical course and long-term outcome in acute ischemic stroke. *Clin Neurol Neurosurg*. 2006 Sep; 108(6): 558-63.
21. González-García S, González-Quevedo A, Fernández-Concepción O, Peña-Sánchez M, Menéndez-Saínz C, Hernández-Díaz Z, et al. Short-term prognostic value of serum neuron specific enolase and S100B in acute stroke patients. *Clin Biochem*. 2012 Nov; 45(16-17): 1302-7.
22. Foerch C, Singer OC, Neumann-Haefelin T, du Mesnil de Rochemont R, Steinmetz H, Sitzler M. Evaluation of serum S100B as a surrogate marker for long-term outcome and infarct volume in acute middle cerebral artery infarction. *Arch Neurol*. 2005 Jul;62(7):1130-4.
23. Foerch C, Otto B, Singer OC, Neumann-Haefelin T, Yan B, Berkefeld J, et al. Serum S100B predicts a malignant course of infarction in patients with acute middle cerebral artery occlusion. *Stroke*. 2004 Sep; 35(9): 2160-4.
24. Delgado P, Alvarez Sabin J, Santamarina E, Molina CA, Quintana M, Rosell A, et al. Plasma S100B level after acute spontaneous intracerebral hemorrhage. *Stroke*. 2006 Nov; 37(11): 2837-9.

25. Tuttolomondo A, Di Sciacca R, Di Raimondo D, Serio A, D'Aguanno G, La Placa S, et al. Plasma levels of inflammatory and thrombotic/fibrinolytic markers in acute ischemic strokes: relationship with TOAST subtype, outcome and infarct site. *J Neuroimmunol*. 2009 Oct 30; 215(1-2): 84-9.
26. Basic Kes V, Simundic AM, Nikolac N, Topic E, Demarin V. Pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in acute ischemic stroke and their relation to early neurological deficit and stroke outcome. *Clin Biochem*. 2008 Nov; 41(16-17): 1330-4.
27. Smith CJ, Emsley HC, Gavin CM, Georgiou RF, Vail A, et al. Peak plasma interleukin-6 and other peripheral markers of inflammation in the first week of ischaemic stroke correlate with brain infarct volume, stroke severity and long-term outcome. *BMC Neurol*. 2004 Jan 15; 4: 2-9.
28. Sotgiu S, Zanda B, Marchetti B, Fois ML, Arru G, Pes GM, et al. Inflammatory biomarkers in blood of patients with acute brain ischemia. *Eur J Neurol*. 2006 May; 13(5): 505-13.
29. Whiteley W, Jackson C, Lewis S, Lowe G, Rumley A, Sandercock P, et al. Inflammatory markers and poor outcome after stroke: a prospective cohort study and systematic review of interleukin-6. *PLoS Med*. 2009 Sep; 6(9): e1000145 (1-12).
30. Bustamante A, Sobrino T, Giralt D, García-Berrocso T, Llombart V, Ugarriza I, et al. Prognostic value of blood interleukin-6 in the prediction of functional outcome after stroke: a systematic review and meta-analysis. *J Neuroimmunol*. 2014 Sep 15; 274(1-2): 215-24.
31. Rajeshwar K, Kaul S, Al-Hazzani A, Babu MS, Balakrishna N, Sharma V, et al. C-reactive protein and nitric oxide levels in ischemic stroke and its subtypes: correlation with clinical outcome. *Inflammation*. 2012 Jun; 35(3): 978-84.
32. Pepys MB, Hirschfield GM, Tennent GA, Gallimore JR, Kahan MC, Bellotti V, et al. Targeting C-reactive protein for the treatment of cardiovascular disease. *Nature*. 2006 Apr 27; 440(7088): 1217-21.
33. Muir KW, Weir CJ, Alwan W, Squire IB, Lees KR. C-reactive protein and outcome after ischemic stroke. *Stroke*. 1999 May; 30(5): 981-5.
34. Winbeck K, Poppert H, Etgen T, Conrad B, Sander D. Prognostic relevance of early serial C-reactive protein measurements after first ischemic stroke. *Stroke*. 2002 Oct; 33(10): 2459-64.
35. Hamidon BB, Sapiyah S, Nawawi H, Raymond AA. The prognostic value of C-reactive protein (CRP) levels in patients with acute ischaemic stroke. *Med J Malaysia*. 2004 Dec; 59(5): 631-7.

36. Masotti L, Ceccarelli E, Forconi S, Cappelli R. Prognostic role of C-reactive protein in very old patients with acute ischaemic stroke. *J Intern Med.* 2005 Aug; 258(2): 145-52.
37. Rallidis LS, Vikelis M, Panagiotakos DB, Rizos I, Zolindaki MG, Kaliva K, et al. Inflammatory markers and in-hospital mortality in acute ischaemic stroke. *Atherosclerosis.* 2006 Nov; 189(1): 193-7.
38. den Hertog HM, van Rossum JA, van der Worp HB, van Gemert HM, de Jonge R, Koudstaal PJ, et al. C-reactive protein in the very early phase of acute ischemic stroke: association with poor outcome and death. *J Neurol.* 2009 Dec; 256(12): 2003-8.
39. Rocco A, Ringleb PA, Griftner U, Nolte CH, Schneider A, Nagel S. Follow-up C-reactive protein level is more strongly associated with outcome in stroke patients than admission levels. *Neurol Sci.* 2015 Jul 25; 15: 2342-7.
40. VanGilder RL, Davidov DM, Stinehart KR, Huber JD, Turner RC, Wilson KS, et al. C-reactive protein and long-term ischemic stroke prognosis. *Clin Neurosci.* 2014 Apr; 21(4): 547-53.
41. Elkind MS, Luna JM, McClure LA, Zhang Y, Coffey CS, Roldan A, Del Brutto OH, et al; LIMITS Investigators. C-reactive protein as a prognostic marker after lacunar stroke: levels of inflammatory markers in the treatment of stroke study. *Stroke.* 2014 Mar; 45(3): 707-16.
42. Pikula A, Beiser AS, Chen TC, Preis SR, Vargias D, DeCarli C, et al. Serum brain-derived neurotrophic factor and vascular endothelial growth factor levels are associated with risk of stroke and vascular brain injury: Framingham Study. *Stroke.* 2013 Oct; 44(10): 2768-75.
43. Navaratna D, Guo SZ, Hayakawa K, Wang X, Gerhardinger C, Lo EH. Decreased cerebrovascular brain-derived neurotrophic factor-mediated neuroprotection in the diabetic brain. *Diabetes.* 2011 Jun; 60(6): 1789-96.
44. Li J, Zhao YD, Zeng JW, Chen XY, Wang RD, Cheng SY. Serum Brain-derived neurotrophic factor levels in post-stroke depression. *J Affect Disord.* 2014 Oct; 168: 373-9.
45. Di Lazzaro V, Profice P, Pilato F, Dileone M, Florio L, Tonali PA, et al. BDNF plasma levels in acute stroke. *Neurosci Lett.* 2007 Jul 11; 422(2): 128-30.
46. Yang L, Zhang Z, Sun D, Xu Z, Yuan Y, Zhang X, et al. Low serum BDNF may indicate the development of PSD in patients with acute ischemic stroke. *Int J Geriatr Psychiatry.* 2011 May; 26(5): 495-502.
47. 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): 1404-10.

48. 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): 864-70.
49. 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): 849-77.
50. 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): 675-82.
51. 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): 604-7.
52. 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): 2027-30.
53. 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): 1163-70.
54. 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): 9855-61.
55. Nasi LA. *Rotinas em Unidade Vascular*. Porto Alegre, BR: Artmed; 2012.

7. ARTIGO

Blood Biomarkers for Acute Stroke Prognostics

Authors: Backes FN¹, Bianchin MM², Vieira SRR³, Souza A⁴

¹ Student of post-graduate of Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) and doctor of medical team of 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. E-mail: fabianebackes@gmail.com

² Professor of 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. E-mail: mmbianchin@hotmail.com

³ Professor of 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. E-mail: srvieira@terra.com.br

⁴ Professor of School of Pharmacy of Centro Universitário Unilasalle, Rua Victor Barreto 2288, CEP 92010-903, Canoas, RS, Brazil, Tel.: +55-51-81975718. E-mail: andressasz@gmail.com

Abstract

Background and Purpose: Stroke is an important cause of death worldwide, and the majority of stroke survivors suffer from some form of residual disability. 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.

Design and Methods: We investigated 60 patients with acute stroke who were admitted within 24 h of event onset at the intensive care unit or neurovascular emergency unit of Clínicas Hospital. All patients provided venous blood samples for the measurement of neuron-specific enolase (NSE), S100 β protein (S100 β), interleukin-6 (IL-6), C-reactive protein (CRP) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) within 24 h of the acute event, on the third day and on the fifth day 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 of blood collection and at the time of hospital discharge.

Results: The serum levels of the S100 β protein, IL-6 and CRP seem to constitute the best panel of biomarkers after acute stroke in this study. When patients were subdivided into two groups according to the NIHSS (NIHSS \leq 6 and NIHSS $>$ 6) and mRS (mRS \leq 3 and mRS $>$ 3) scores, which were used as neurological outcome measures, both neurologic scores for good outcome (NIHSS \leq 6 and mRS \leq 3) at hospital discharge were significantly related to the S100 β protein and IL-6 levels at all of the measured time points. Among the analyzed blood markers, S100 β , IL-6 and PCR levels significantly correlated with the stroke scales and prognostic value.

Conclusion: Blood biomarkers may be useful in acute stroke either by suggesting stroke severity or providing a prognostic value. The addition of the S100 β protein, IL-6 and CRP to previously validated stroke scales slightly improves the ability of these scales to predict outcome.

Keywords: cerebral stroke, blood biomarkers, outcome, neuron-specific enolase, S100 β protein, interleukin-6, C-reactive protein, brain-derived neurotrophic factor.

Introduction

Stroke is the most prevalent neurologic emergency and an important cause of death worldwide. The majority of stroke survivors suffer from some form of residual disability, and a considerable proportion of these patients will nonetheless regain functional independence¹.

Many recent studies have examined the association between blood biomarkers and poor outcome after stroke². However, finding a panel of blood markers that may also predict the risk of early complications after stroke is difficult. Such a panel would allow closer monitoring and earlier interventions and improve the prognostic capability of validated prognostic variables, such as stroke scales. The aforementioned difficulty may relate to the fact that stroke is a heterogeneous disease, that is characterized by different etiologies, locations and sizes. Furthermore, the complexity of the ischemic cascade, the inflammation reactions and the impact of the blood-brain barrier on the diffusion of blood biomarkers hinder the selection of an ideal neurobiomarker^{3, 4}.

The ability of blood markers of any pathological process of acute stroke, such as inflammation, hemostasis, neuronal and glial injury, to improve the prognostic accuracy after stroke is useful for clinical and research purposes^{5, 6}. Ideally, markers of acute stroke would peak and accumulate early in the damage cascade, rapidly diffuse through injured tissue into bloodstream, have a half-life of at least a few hours, and be specific for neural tissue⁷.

Several proteins normally located within brain tissue are released during cerebral injury to the cerebrospinal fluid and blood and may be detected by biochemical methods. Therefore, proteins such as neuron specific-enolase (NSE) and S100 β protein could serve as markers of the extent of damage⁸. Inflammatory reactions play a pivotal role in the pathophysiology of acute stroke. This process appears to be initiated and modulated by cytokines, which are released by leukocytes, endothelial cells, astrocytes and microglial cells. Pro-inflammatory cytokines, such as interleukin 6 (IL-6) and C-reactive protein (CRP), are elevated in the serum and cerebrospinal fluid after the early phase of stroke^{9, 10}. Neurotrophins

are other molecules involved in the cerebrovascular diseases mechanism. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) has been found to play a role in maintaining neuronal plasticity and neuronal repair by promoting neurogenesis and angiogenesis. Some studies suggest that BDNF exerts a protective effect after stroke^{11, 12}.

Specifically, our objectives were the following: (1) to determine whether the serum concentrations of NSE, S100 β protein, IL-6, CRP and BDNF correlate with neurologic outcomes, as measured by the stroke scales of the National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS) and modified Rankin Scale (mRS) during the time of observation and at hospital discharge; (2) to determine whether serial measurements of NSE, S100 β protein, IL-6, CRP and BDNF are useful to predict outcomes and identify the best time to conduct the measurement; (3) to determine whether the serum concentrations of NSE, S100 β protein, IL-6, CRP and BDNF correlate with favorable or unfavorable outcome; (4) to determine whether the serum concentrations of NSE, S100 β protein, IL-6, CRP and BDNF correlate with hospital stay after stroke; and (5) to determine whether the serum levels of NSE, S100 β protein, IL-6, CRP and BDNF differ between ischemic and hemorrhagic stroke.

Material and Methods

Design, Setting and Patients

Between February and May 2015, a prospective observational study was conducted at the 44-bed medical and surgical adult intensive care unit and 9-bed neurovascular emergency unit of Clínicas Hospital, a 773-bed tertiary referral hospital in the city of Porto Alegre, Brazil. The study was approved by the National and Institutional Committee of Ethics (CAAE: 29531614.1.0000.5327 and CEP-HCPA: 15-0081). All participants or their legal designees provided written informed consent.

All patients admitted to our intensive care unit or neurovascular emergency unit with acute stroke within 24 h of stroke onset were enrolled. Demographics, vascular risk factors, clinical characteristics, laboratory results, and previous medication were recorded. All patients provided venous blood samples for NSE, S100 β protein, IL-6, CRP and BDNF measurements within 24 h of the acute event, on the third day and on the fifth day after the stroke.

The inclusion criteria for the study were patients with acute stroke admitted within 24 h of onset, diagnosis confirmed by computerized tomography (CT) or magnetic resonance imaging (MRI), and patients above the age of 18 years. Exclusion criteria were patients with terminal cancer.

Neurological stroke severity and global disability were determined with the National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS) and modified Rankin Scale (mRS) within 24 h 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 same group of experienced neurologists and a neurointensivist performed all neurological examinations.

The blood samples was collected and frozen at -80°C until the time of testing. The levels of NSE, S100 β protein, IL-6 and BDNF were determined with a sandwich-ELISA using monoclonal antibodies specific for each marker (NSE: ICL – Immunology Consultants Laboratory, E-80NEN; S100 β : EMD – Merck Millipore, EZHS100B-33K; IL-6: EMD – Merck Millipore, EZHIL6; BDNF: EMD – Merck Millipore, CYT306). However, the CRP samples were collected and analyzed on the same day. The levels of CRP were determined by turbidimetry (Roche COBAS-c501, 20764930-322).

Statistical Analysis

Categorical data are expressed as counts and percentages. Continuous data are described as the means \pm standard deviations (SD). When distributional

assumptions were questionable, we used the median and interquartile range (P25th to P75th). The correlation between biomarkers and stroke severity scores was assessed using Spearman's rank correlation coefficient (r_s). The predictive ability of biomarkers for good outcomes is expressed using the area under the ROC curve (AUC) followed by its 95% confidence interval.

To evaluate changes in biomarkers during the observational period, we used a generalized estimating equations (GEE) model with a Gamma log link function because the response variables were skewed.

To compare biomarkers between the groups created by the type of stroke and the dichotomization of severity scores, we used the non-parametric Mann-Whitney U test. The correlation between the length of hospital stay and biomarkers was also evaluated using Spearman's rank correlation coefficient.

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

Results

The study included 60 patients with acute stroke who fulfilled the inclusion criteria. Of these patients, 3 were excluded from the present study because of a late diagnosis of stroke mimics.

The mean age \pm SD of the patients was 62 \pm 14 years. The most common type of stroke in the study was ischemic stroke (88.3%), and 28.3% of these patients were treated with intravenous thrombolysis. Table 1 shows the baseline characteristics of the patients.

The median CRP concentrations were significantly higher in patients on the third day after stroke than 24 h after stroke ($p<0.05$), but no differences were observed for other biomarkers over time (table 2).

Considering the correlation between biomarkers and stroke scales within 24 h of the acute event, on the third day and the fifth day after stroke, the following exhibited significant correlation: (1) S100 β protein and mRS in all measurements ($r_s=0.47$, $p<0.001$; $r_s=0.55$, $p<0.001$; $r_s=0.54$, $p<0.001$), (2) S100 β protein and NIHSS on the third day and fifth day ($r_s=0.56$, $p<0.001$; $r_s=0.48$, $p<0.001$), (3) IL-6 and mRS and NIHSS on the third day and fifth day (mRS and IL-6: $r_s=0.48$, $p<0.001$; $r_s=0.57$, $p<0.001$; NIHSS and IL-6: $r_s=0.45$, $p<0.001$; $r_s=0.61$, $p<0.001$), and (4) CRP and mRS and NIHSS within 24 h and on the third day (mRS and CRP: $r_s=0.46$, $p<0.001$; $r_s=0.47$, $p<0.001$; NIHSS and CRP: $r_s=0.48$, $p<0.001$; $r_s=0.46$, $p<0.001$) (table 3).

The S100 β protein, IL-6 and CRP levels on the third day and the fifth day after stroke significantly correlated with the mRS score at hospital discharge (S100 β and mRS: $r_s=0.46$, $p<0.001$; $r_s=0.45$, $p=0.001$; IL-6 and mRS: $r_s=0.50$, $p<0.001$; $r_s=0.59$, $p<0.001$; CRP and mRS: $r_s=0.44$, $p<0.001$; $r_s=0.41$, $p=0.002$). Furthermore, the NIHSS score at hospital discharge was significantly correlated with the S100 β protein level on the third day ($r_s=0.41$, $p=0.002$) and IL-6 level on the third day and fifth day after diagnosis ($r_s=0.44$, $p=0.001$; $r_s=0.52$, $p<0.001$) (table 4).

The patients were subdivided into two groups according to the NHISS (NIHSS ≤ 6 and NIHSS > 6) and mRS (mRS ≤ 3 and mRS > 3) scores, which were employed as neurological outcome measures. Both neurologic scores for good outcome (NIHSS ≤ 6 and mRS ≤ 3) at hospital discharge that were related to the S100 β protein and IL-6 levels in all measurements had good predicted value, as expressed using the area under the ROC curve (NIHSS ≤ 6 and S100 β : AUC=0.7, $p=0.03$; AUC=0.7, $p=0.01$; AUC=0.7, $p=0.05$; NIHSS ≤ 6 and IL-6: AUC =0.7, $p=0.04$; AUC=0.7, $p=0.02$; AUC=0.8, $p=0.002$ // mRS ≤ 3 and S100 β : AUC=0.8, $p=0.001$; AUC=0.8, $p=0.002$; AUC=0.7, $p=0.008$; mRS ≤ 3 and IL-6: AUC=0.7, $p=0.07$; AUC=0.7, $p=0.02$; AUC=0.8, $p=0.003$) (table 5).

The serum concentrations of S100 β protein within 24 h and on the third day and those of IL-6 in all measurements after stroke were significantly higher in patients with NIHSS > 6 at hospital discharge ($p<0.05$) (table 6). Moreover, the serum levels of S100 β protein and IL-6 in all measurements were significantly higher in patients with mRS > 3 at hospital discharge, indicating poor outcome ($p<0.05$)

(table 7). The length of hospital stay did not significantly correlate with all biomarkers, although hospital stays tended to be longer in patients with high levels of CRP within 24 h of stroke (table 8).

The serum concentrations of biomarkers did not significantly differ at any of the time points after diagnosis between ischemic and hemorrhagic stroke ($p>0.05$) (table 9 and figure 1). Nevertheless, the analyzed blood markers correlated better with the stroke scores (NIHSS and mRS) for ischemic stroke than for hemorrhagic stroke (table 10).

The serum concentrations of NSE and BDNF were not significantly associated with the stroke scores during the time of observation.

Discussion

Many of the analyzed serum biomarkers are associated with poor outcome after stroke. However, the clinical significance of most blood markers is uncertain⁵. Panels of biomarkers are under study to improve the predictive value of clinical variables such as stroke scales, but the publication results are conflicting^{3, 5, 6}.

NSE is a dimeric glycolytic enzyme that originates predominantly from the cytoplasm of neurons and cells of neuroendocrine origin. It has been found in other cells such as erythrocytes and platelets, but in smaller concentrations. The NSE concentrations in the cerebrospinal fluid and blood are increased in various neurological diseases^{8, 13}.

Previous studies demonstrated significantly higher mean serum NSE concentrations in cerebrovascular disease patients than in controls^{8, 13, 14}. Furthermore, the volume of the injured area correlated with the levels of NSE in many studies^{8, 13, 15}. Nonetheless, the association between the NSE blood levels and the clinical outcome remains controversial. Some studies found a significant correlation

between elevated NSE concentrations, mainly within 72 h after stroke, and neurological poor outcome or disability^{13, 14, 16, 17, 18}. Conversely, some reports did not correlate the NSE levels alone with the severity of stroke and clinical outcome^{8, 15}. Our study analyzed the levels of NSE at three different time points (within 24 h, on the third day and the fifth day after stroke) and correlated these concentrations with stroke scores, which served as neurological outcome measures, at the same time points and at discharge, but did not find a significant correlation.

The glial protein S100 β belongs to a family of calcium-binding proteins found as hetero- or homodimers of two subunits, alpha and beta (alpha-alpha, alpha-beta and beta-beta). Types alpha-beta and beta-beta are described as S100 β protein and are present in high concentrations in glial and Schwann cells. Under normal conditions, S100 β is not detected in the cerebrospinal fluid or blood, but S100 β is released into these two fluids upon structural damage. Specifically, higher levels of S100 β protein in the cerebrospinal fluid than in the blood are a marker of blood-brain barrier dysfunction^{7, 15, 16}.

Many studies have demonstrated S100 β protein as a stroke marker that significantly correlates with lesion size, stroke severity and functional outcome^{7, 8, 15, 16, 18}. The median S100 β level was higher in patients who deteriorated early and exhibited an unfavorable outcome¹⁹. Because of its lack of specificity, S100 β protein cannot be regarded as a diagnostic tool for stroke, but it may be use for prognostic purposes^{7, 19, 20}. The S100 β protein concentration in the blood increases soon after stroke, reaching maximum levels 2 to 4 days after onset, and it directly correlates with infarct size. Therefore, S100 β protein can improve the monitoring of patients who are at high risk of deterioration after stroke and predict malignant courses of infarction with herniation^{7, 21, 22}. Our results were similar to those reported from previous studies^{7, 8, 15, 16, 18, 19, 20, 21, 22}. The levels of S100 β protein were elevated within 24 h, on the third day and on the fifth day after stroke. The S100 β concentrations significantly correlated with the mRS and NIHSS scores during the observation period and at hospital discharge. The serum concentrations of S100 β did not significantly differ between ischemic and hemorrhagic stroke at the three time points of measurement. The levels of S100 β were good predictors of outcome when patients were subdivided into two groups according to the NIHSS (NIHSS \leq 6 and NIHSS $>$ 6) and to the mRS (mRS \leq 3 and mRS $>$ 3) scores.

Some evidence suggests that inflammation plays an important role in the pathophysiology of acute stroke. Inflammatory reactions are initiated and modulated by cytokines, which are released by leukocytes, endothelial cells, astrocytes and microglial cells. The mechanism of cytokine release is mediated by sympathetic nervous system activity and catecholamines. The concentrations of pro-inflammatory cytokines, including IL-6, are elevated in the blood and cerebrospinal fluid in the early phase of acute cerebrovascular disease. These inflammatory modulators recruit more circulating leukocytes that infiltrate the injured region and increase cerebral tissue damage^{9, 23}.

Several studies, including two systematic reviews, have associated high levels of IL-6 after stroke with poor functional outcome^{24, 25}. The concentrations of IL-6 are increased in the early stroke period, and infarct size may influence the serum levels of this biomarker. Therefore, elevated levels of IL-6 are correlated with stroke severity, neuroimaging infarct volume and clinical outcome^{26, 27, 28}. In contrast, one report suggested that the IL-6 level is associated with neuroprotection in patients using other medications, such as statins, within one day of stroke²⁹. In our study, the IL-6 level significantly correlated with the stroke score (NIHSS and mRS) on the third day and fifth day after stroke as well as at hospital discharge. Moreover, our data showed that the short-term outcome of patients significantly correlated with the IL-6 concentration and stroke severity.

CRP is an acute phase reactant that is mainly produced in the liver, up-regulated by inflammatory cytokines and expressed in the smooth muscle cells of atherosclerotic arteries. Elevated plasma CRP levels have been associated with an increased risk of cerebrovascular events because this protein is implicated in multiple aspects of atherogenic plaque vulnerability³⁰. Moreover, elevated CRP concentrations increased secondary brain damage by activating the complement system^{27, 30, 31}.

Many studies have analyzed the relationship between CRP and acute stroke. Except for few discordant results, the main conclusion of these reports are that high levels of CRP in the acute phase after stroke are associated with larger infarcts, recurrent strokes, and unfavorable short- and long-term functional outcome^{10, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37}. In the present study, we found that the levels of CRP were elevated

after stroke, mainly on the third day after stroke. The CRP concentrations significantly correlated with the mRS and NIHSS scores within 24 h and on the third day. We also observed a tendency for longer hospital stays in patients with high levels of CRP within 24 h after stroke. However, the association between the levels of CRP and neurological outcomes observed herein was only moderately significant, which can be attributed to the heterogeneity of the study group.

BDNF is a neurotrophin that is present during early neuronal development. It plays a role in maintaining neuronal plasticity and neuronal repair by promoting neurogenesis and angiogenesis. Experimental studies have suggested that neurons and glial cells act as endogenous sources of BDNF after ischemia or other brain injuries. BDNF causes vasodilation by increasing prostacyclin synthesis, protecting tissues from vasoconstriction-related injury and preventing thrombus formation in the cerebral vessel wall. Thus, BDNF may reduce the risk of stroke due to its vascular and neurotrophic effects^{11, 38, 39}. BDNF might pass through the blood-brain barrier when it is disrupted by an injury, such as stroke, and the migration of BDNF to the site of lesion can exert protective effects^{12, 29}.

A smaller number of studies have correlated the BDNF level with the variables studied in this paper. Low circulating BDNF concentrations have been observed in patients with risk factors for stroke, such as type 2 diabetes mellitus, coronary artery disease, metabolic syndrome and physical inactivity³⁸. Increased levels of BDNF after stroke were associated with reduced white matter hyperintensity on MRI, better visual memory and reduced post-stroke depression^{11, 38, 40}. However, the serum BDNF level did not significantly correlate with the stroke score in most studies⁴⁰. We also did not observe a significant increase in the serum concentration of BDNF after stroke. In addition, the BDNF levels did not significantly correlate with the stroke score (NIHSS and mRS), clinical prognosis and length of stay.

In this study, the serum levels of S100 β protein, IL-6 and CRP appear to constitute the best panel of biomarkers. Among the analyzed blood markers, the levels of these proteins significantly correlated with the stroke score and provided prognostic value.

Some limitations of this research should be considered. The present study included a variety of stroke subtypes 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. We used stroke scales to estimate stroke severity and patient outcomes, but these scores do not capture all stroke-related impairments. We selected a small number of blood biomarkers involved in the pathophysiology of stroke to verify the association with outcomes after stroke. Therefore, the present results should be confirmed in further larger studies.

Conclusion

Blood biomarkers may be useful in acute stroke either by suggesting stroke severity or providing a prognostic value. The addition of the S100 β protein, IL-6 and CRP levels to previously validated stroke scales slightly improves the ability of these scales to predict outcome. However, these biomarkers do not replace clinical scales to predict neurological outcome after stroke. According to our study, the accuracy of biomarkers to predict outcome after acute stroke is too low to be clinically useful. Thus, this topic requires further study to identify an ideal panel of biomarkers for acute stroke that has clinical prognostic relevance.

References

1. Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M, et al; American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics--2015 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2015 Jan 27;131(4):e29-322.
2. 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.

3. Jickling GC, Sharp FR. Biomarker panels in ischemic stroke. *Stroke*. 2015 Mar;46(3):915-20.
4. Raman K, Paré G. Of stroke and biomarkers: the elusive quest for a clinical biomarker panel. *Clin Biochem*. 2013 Jun;46(9):705-6.
5. Whiteley W, Chong WL, Sengupta A, Sandercock P. Blood markers for the prognosis of ischemic stroke: a systematic review. *Stroke*. 2009 May;40(5):e380-9.
6. 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):230-40.
7. Nash DL, Bellolio MF, Stead LG. S100 as a marker of acute brain ischemia: a systematic review. *Neurocrit Care*. 2008;8(2):301-7.
8. Kaca-Oryńska M, Tomasiuk R, Friedman A. Neuron-specific enolase and S 100B protein as predictors of outcome in ischaemic stroke. *Neurol Neurochir Pol*. 2010 Sep-Oct;44(5):459-63.
9. Oto J, Suzue A, Inui D, Fukuta Y, Hosotsubo K, Torii M, et al. Plasma proinflammatory and anti-inflammatory cytokine and catecholamine concentrations as predictors of neurological outcome in acute stroke patients. *J Anesth*. 2008;22(3):207-12.
10. Hamidon BB, Sapiyah S, Nawawi H, Raymond AA. The prognostic value of C-reactive protein (CRP) levels in patients with acute ischaemic stroke. *Med J Malaysia*. 2004 Dec;59(5):631-7.
11. Li J, Zhao YD, Zeng JW, Chen XY, Wang RD, Cheng SY. Serum Brain-derived neurotrophic factor levels in post-stroke depression. *J Affect Disord*. 2014 Oct;168:373-9.
12. Di Lazzaro V, Profice P, Pilato F, Dileone M, Florio L, Tonali PA, et al. BDNF plasma levels in acute stroke. *Neurosci Lett*. 2007 Jul 11;422(2):128-30.
13. Schaarschmidt H, Prange HW, Reiber H. Neuron-specific enolase concentrations in blood as a prognostic parameter in cerebrovascular diseases. *Stroke*. 1994 Mar;25(3):558-65.
14. Bharosay A, Bharosay VV, Varma M, Saxena K, Sodani A, Saxena R. Correlation of Brain Biomarker Neuron Specific Enolase (NSE) with Degree of Disability and Neurological Worsening in Cerebrovascular Stroke. *Indian J Clin Biochem*. 2012 Apr;27(2):186-90.
15. Missler U, Wiesmann M, Friedrich C, Kaps M. S-100 protein and neuron-specific enolase concentrations in blood as indicators of infarction volume and prognosis in acute ischemic stroke. *Stroke*. 1997 Oct;28(10):1956-60.

16. Brea D, Sobrino T, Blanco M, Cristobo I, Rodríguez-González R, Rodríguez-Yañez M, et al. Temporal profile and clinical significance of serum neuron-specific enolase and S100 in ischemic and hemorrhagic stroke. *Clin Chem Lab Med*. 2009;47(12):1513-8.
17. Wunderlich MT, Lins H, Skalej M, Wallesch CW, Goertler M. Neuron-specific enolase and tau protein as neurobiochemical markers of neuronal damage are related to early clinical course and long-term outcome in acute ischemic stroke. *Clin Neurol Neurosurg*. 2006 Sep;108(6):558-63.
18. González-García S, González-Quevedo A, Fernández-Concepción O, Peña-Sánchez M, Menéndez-Saínz C, Hernández-Díaz Z, et al. Short-term prognostic value of serum neuron specific enolase and S100B in acute stroke patients. *Clin Biochem*. 2012 Nov;45(16-17):1302-7.
19. Delgado P, Alvarez Sabin J, Santamarina E, Molina CA, Quintana M, Rosell A, et al. Plasma S100B level after acute spontaneous intracerebral hemorrhage. *Stroke*. 2006 Nov;37(11):2837-9.
20. Foerch C, Singer OC, Neumann-Haefelin T, du Mesnil de Rochemont R, Steinmetz H, Sitzer M. Evaluation of serum S100B as a surrogate marker for long-term outcome and infarct volume in acute middle cerebral artery infarction. *Arch Neurol*. 2005 Jul;62(7):1130-4.
21. Foerch C, Otto B, Singer OC, Neumann-Haefelin T, Yan B, Berkefeld J, et al. Serum S100B predicts a malignant course of infarction in patients with acute middle cerebral artery occlusion. *Stroke*. 2004 Sep;35(9):2160-4.
22. Kumar H, Lakhota M, Pahadiya H, Singh J. To study the correlation of serum S-100 protein level with the severity of stroke and its prognostic implication. *J Neurosci Rural Pract*. 2015 Jul-Sep;6(3):326-30.
23. Tuttolomondo A, Di Sciacca R, Di Raimondo D, Serio A, D'Aguanno G, La Placa S, et al. Plasma levels of inflammatory and thrombotic/fibrinolytic markers in acute ischemic strokes: relationship with TOAST subtype, outcome and infarct site. *J Neuroimmunol*. 2009 Oct 30;215(1-2):84-9.
24. Whiteley W, Jackson C, Lewis S, Lowe G, Rumley A, Sandercock P, et al. Inflammatory markers and poor outcome after stroke: a prospective cohort study and systematic review of interleukin-6. *PLoS Med*. 2009 Sep;6(9):e1000145 (1-12).
25. Bustamante A, Sobrino T, Giralt D, García-Berrocso T, Llombart V, Ugarriza I, et al. Prognostic value of blood interleukin-6 in the prediction of functional outcome after stroke: a systematic review and meta-analysis. *J Neuroimmunol*. 2014 Sep 15;274(1-2):215-24.
26. Basic Kes V, Simundic AM, Nikolac N, Topic E, Demarin V. Pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in acute ischemic stroke and their relation to early

- neurological deficit and stroke outcome. *Clin Biochem.* 2008 Nov;41(16-17):1330-4.
27. Smith CJ, Emsley HC, Gavin CM, Georgiou RF, Vail A, et al. Peak plasma interleukin-6 and other peripheral markers of inflammation in the first week of ischaemic stroke correlate with brain infarct volume, stroke severity and long-term outcome. *BMC Neurol.* 2004 Jan 15;4:2-9.
 28. Rallidis LS, Vikelis M, Panagiotakos DB, Rizos I, Zolindaki MG, Kaliva K, et al. Inflammatory markers and in-hospital mortality in acute ischaemic stroke. *Atherosclerosis.* 2006 Nov;189(1):193-7.
 29. Sotgiu S, Zanda B, Marchetti B, Fois ML, Arru G, Pes GM, et al. Inflammatory biomarkers in blood of patients with acute brain ischemia. *Eur J Neurol.* 2006 May;13(5):505-13.
 30. Rajeshwar K, Kaul S, Al-Hazzani A, Babu MS, Balakrishna N, Sharma V, et al. C-reactive protein and nitric oxide levels in ischemic stroke and its subtypes: correlation with clinical outcome. *Inflammation.* 2012 Jun;35(3):978-84.
 31. den Hertog HM, van Rossum JA, van der Worp HB, van Gemert HM, de Jonge R, Koudstaal PJ, et al. C-reactive protein in the very early phase of acute ischemic stroke: association with poor outcome and death. *J Neurol.* 2009 Dec;256(12):2003-8.
 32. Elkind MS, Luna JM, McClure LA, Zhang Y, Coffey CS, Roldan A, Del Brutto OH, et al; LIMITS Investigators. C-reactive protein as a prognostic marker after lacunar stroke: levels of inflammatory markers in the treatment of stroke study. *Stroke.* 2014 Mar;45(3):707-16.
 33. Muir KW, Weir CJ, Alwan W, Squire IB, Lees KR. C-reactive protein and outcome after ischemic stroke. *Stroke.* 1999 May;30(5):981-5.
 34. VanGilder RL, Davidov DM, Stinehart KR, Huber JD, Turner RC, Wilson KS, et al. C-reactive protein and long-term ischemic stroke prognosis. *Clin Neurosci.* 2014 Apr;21(4):547-53.
 35. Rocco A, Ringleb PA, Grittner U, Nolte CH, Schneider A, Nagel S. Follow-up C-reactive protein level is more strongly associated with outcome in stroke patients than admission levels. *Neurol Sci.* 2015 Jul 25; 15:2342-7.
 36. Winbeck K, Poppert H, Etgen T, Conrad B, Sander D. Prognostic relevance of early serial C-reactive protein measurements after first ischemic stroke. *Stroke.* 2002 Oct;33(10):2459-64.
 37. Masotti L, Ceccarelli E, Forconi S, Cappelli R. Prognostic role of C-reactive protein in very old patients with acute ischaemic stroke. *J Intern Med.* 2005 Aug;258(2):145-52.

38. Pikula A, Beiser AS, Chen TC, Preis SR, Vargias D, DeCarli C, et al. Serum brain-derived neurotrophic factor and vascular endothelial growth factor levels are associated with risk of stroke and vascular brain injury: Framingham Study. *Stroke*. 2013 Oct;44(10):2768-75.
39. Navaratna D, Guo SZ, Hayakawa K, Wang X, Gerhardinger C, Lo EH. Decreased cerebrovascular brain-derived neurotrophic factor-mediated neuroprotection in the diabetic brain. *Diabetes*. 2011 Jun;60(6):1789-96.
40. Yang L, Zhang Z, Sun D, Xu Z, Yuan Y, Zhang X, et al. Low serum BDNF may indicate the development of PSD in patients with acute ischemic stroke. *Int J Geriatr Psychiatry*. 2011 May;26(5):495-502

| Table 1 – Baseline characteristics of the study population. | |
|--|----------------------|
| Characteristics | n=60 |
| Age, years | 62±14 |
| Gender, n° (%) | |
| Male | 32 (53.3) |
| Female | 28 (46.7) |
| Ethnic, n° (%) | |
| White | 83.3 (50) |
| Black | 3.3 (2) |
| Miscellanea | 13.3 (8) |
| Type of stroke, n° (%) | |
| Ischemic | 53 (88.3) |
| Hemorrhagic | 7 (11.7) |
| Thrombolysis, n° (%) | |
| | 15 (25.0) |
| NIHSS at admission | |
| | 6.0 (4.0 to 13.8) |
| NIHSS at hospital discharge ^a | |
| | 3.0 (1.0 to 7.0) |
| mRS at admission | |
| | 3.0 (2.0 to 4.0) |
| mRS at hospital discharge | |
| | 1.5 (1.0 to 3.75) |
| Length of stay (days) | |
| | 10 (6 to 17) |
| Mortality, n° (%) | |
| | 4 (6.7) |

Data are described as the mean±standard deviations, counts (percentages) or median (interquartile range: P25 to P75). Abbreviations: NIHSS, National Institutes of Health Stroke Scale; mRS, modified Rankin scale. ^an=56.

Table 2 – Blood biomarkers according to moments of observation, n=57.

| Biomarker | Within 24h | Third day ^a | Fifth day ^b | p |
|--------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|-------|
| NSE | 3.27 (1.58 to 6.13) | 3.23 (1.66 to 6.75) | 3.60 (1.92 to 7.34) | 0.090 |
| S100 β | 50.38 (18.84 to 98.64) | 51.02 (25.59 to 197.86) | 73.70 (19.89 to 119.06) | 0.625 |
| IL-6 | 11.22 (5.90 to 29.81) | 9.98 (5.68 to 26.48) | 13.57 (6.26 to 30.77) | 0.220 |
| BDNF | 24.55 (15.91 to 31.26) | 23.91 (16.10 to 30.98) | 22.86 (15.44 to 30.81) | 0.234 |
| CRP | 6.40 (2.73 to 14.70) | 10.00* (3.30 to 25.30) | 9.65* (3.25 to 26.48) | 0.009 |

Data are described as median and interquartile range (P25 to P75). Abbreviations: NSE, neuron-specific enolase; S100 β , S100 β protein; IL-6, interleukin 6; BDNF, serum brain-derived neurotrophic factor; CRP, C reactive protein. ^an=56; ^bn=52. *Significantly different from the value of the first 24 h (p<0.05).

Table 3 - Correlation matrix between biomarkers and stroke scales NIHSS and mRS, n=57.

| Biomarker | Within 24h | | Third day ^a | | Fifth day ^b | |
|--------------|------------------|------------------|------------------------|------------------|------------------------|------------------|
| | NIHSS | mRS | NIHSS | mRS | NIHSS | mRS |
| NSE | 0.25 (0.060) | 0.25 (0.061) | 0.25 (0.064) | 0.24 (0.073) | 0.22 (0.110) | 0.26 (0.065) |
| S100 β | 0.35 (0.008) | 0.47 (<0.001) | 0.56 (<0.001) | 0.55 (<0.001) | 0.48 (<0.001) | 0.54 (<0.001) |
| IL-6 | 0.33 (0.014) | 0.29 (0.028) | 0.45 (<0.001) | 0.48 (<0.001) | 0.61 (<0.001) | 0.57 (<0.001) |
| BDNF | 0.09 (0.515) | 0.02 (0.866) | -0.10 (0.484) | -0.09 (0.527) | -0.10 (0.504) | -0.11 (0.452) |
| CRP | 0.48 (<0.001) | 0.46 (<0.001) | 0.46 (<0.001) | 0.47 (<0.001) | 0.41 (0.002) | 0.36 (0.007) |

Data represent Spearman's rank correlation coefficient (p value). Abbreviations: NIHSS, National Institutes of Health Stroke Scale; mRS, modified Rankin scale; NSE, neuron-specific enolase; S100 β , S100 β protein; IL-6, interleukin 6; BDNF, serum brain-derived neurotrophic factor; CRP, C reactive protein. ^an=56; ^bn=52.

Table 4 – Correlation matrix between biomarkers and stroke scales NIHSS and mRS at discharge, n=57.

| Biomarker | NIHSS at discharge | mRS at discharge |
|--|-------------------------------|-----------------------------|
| NSE within 24h | 0.11 (0.429) | 0.23 (0.091) |
| NSE on the third day ^a | 0.11 (0.449) | 0.23 (0.090) |
| NSE on the fifth day ^b | 0.15 (0.291) | 0.25 (0.081) |
| S100 β within 24h | 0.22 (0.106) | 0.39 (0.002) |
| S100 β on the third day ^a | 0.41 (0.002) | 0.46 (<0.001) |
| S100 β on the fifth day ^b | 0.35 (0.015) | 0.45 (0.001) |
| IL-6 within 24h | 0.31 (0.023) | 0.34 (0.010) |
| IL-6 on the third day ^a | 0.44 (0.001) | 0.50 (<0.001) |
| IL-6 on the fifth day ^b | 0.52 (<0.001) | 0.59 (<0.001) |
| BDNF within 24h | 0.06 (0.696) | 0.06 (0.685) |
| BDNF on the third day ^a | -0.03 (0.831) | 0.01 (0.932) |
| BDNF on the fifth day ^b | -0.05 (0.747) | -0.05 (0.717) |
| CRP within 24h | 0.27 (0.042) | 0.32 (0.014) |
| CRP on the third day ^a | 0.36 (0.007) | 0.44 (0.001) |
| CRP on the fifth day ^b | 0.31 (0.026) | 0.41 (0.002) |

Data represent Spearman's rank correlation coefficient (p value). Abbreviations: NIHSS, National Institutes of Health Stroke Scale; mRS, modified Rankin scale.; NSE, neuron-specific enolase; S100 β , S100 β protein; IL-6, interleukin 6; BDNF, serum brain-derived neurotrophic factor; CRP, C reactive protein. ^an=56; ^bn=52.

Table 5 – Values for area under the ROC curve of serum biomarkers in predicting good outcome of stroke scales NIHSS and mRS, n=57.

| Biomarker | NIHSS ≤ 6 at discharge | mRS ≤ 3 at discharge |
|-------------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|
| NSE within 24h | 0.50 (0.30 to 0.69) | 0.56 (0.36 to 0.76) |
| NSE on the third day ^a | 0.49 (0.30 to 0.68) | 0.58 (0.39 to 0.76) |
| NSE on the fifth day ^b | 0.55 (0.37 to 0.72) | 0.63 (0.45 to 0.80) |
| S100β within 24h | 0.70 (0.54 to 0.86) | 0.81 (0.65 to 0.96) |
| S100β on the third day ^a | 0.73 (0.57 to 0.89) | 0.78 (0.62 to 0.94) |
| S100β on the fifth day ^b | 0.67 (0.50 to 0.85) | 0.74 (0.58 to 0.90) |
| IL-6 within 24h | 0.69 (0.52 to 0.86) | 0.66 (0.49 to 0.83) |
| IL-6 on the third day ^a | 0.71 (0.56 to 0.86) | 0.72 (0.56 to 0.88) |
| IL-6 on the fifth day ^b | 0.78 (0.64 to 0.92) | 0.77 (0.62 to 0.92) |
| BDNF within 24h | 0.47 (0.28 to 0.67) | 0.53 (0.34 to 0.72) |
| BDNF on the third day ^a | 0.42 (0.23 to 0.61) | 0.50 (0.32 to 0.68) |
| BDNF on the fifth day ^b | 0.43 (0.24 to 0.62) | 0.46 (0.27 to 0.64) |
| CRP within 24h | 0.64 (0.48 to 0.80) | 0.61 (0.46 to 0.77) |
| CRP on the third day ^a | 0.59 (0.42 to 0.77) | 0.63 (0.45 to 0.80) |
| CRP on the fifth day ^b | 0.60 (0.42 to 0.78) | 0.64 (0.46 to 0.82) |

Data are presented as the 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; NSE, neuron-specific enolase; S100β, S100β protein; IL-6, interleukin 6; BDNF, serum brain-derived neurotrophic factor; CRP, C reactive protein. ^an=56; ^bn=52.

Table 6 – Comparison of the values of serum biomarkers between patients with NIHSS \leq 6 vs NIHSS $>$ 6.

| Biomarker | NIHSS \leq 6 at discharge (n=41) | NIHSS $>$ 6 at discharge (n=15) | p |
|-------------------------------|--|--|----------|
| NSE within 24h | 3.20 (1.45 to 5.94) | 3.14 (1.51 to 11.83) | 0.953 |
| NSE on the third day | 3.17 (1.64 to 6.74) | 2.57 (1.54 to 13.40) | 0.945 |
| NSE on the fifth day | 3.41 (1.76 to 7.28) | 3.61 (1.85 to 13.69) | 0.618 |
| S100 β within 24h | 34.56 (12.83 to 68.28) | 73.90 (36.01 to 150.03) | 0.013 |
| S100 β on the third day | 35.88 (16.22 to 88.64) | 162.93 (54.84 to 331.42) | 0.007 |
| S100 β on the fifth day | 41.75 (14.67 to 92.59) | 81.18 (38.13 to 185.64) | 0.055 |
| IL-6 within 24h | 9.71 (3.81 to 14.76) | 15.86 (9.02 to 40.86) | 0.038 |
| IL-6 on the third day | 7.82 (3.85 to 20.10) | 20.83 (8.32 to 33.03) | 0.015 |
| IL-6 on the fifth day | 10.81 (4.62 to 17.86) | 29.51 (12.11 to 38.13) | 0.002 |
| BDNF within 24h | 25.05 (17.36 to 30.92) | 24.47 (9.78 to 35.59) | 0.790 |
| BDNF on the third day | 24.79 (16.51 to 31.21) | 22.18 (11.87 to 33.52) | 0.465 |
| BDNF on the fifth day | 23.23 (15.66 to 31.03) | 20.93 (12.93 to 28.09) | 0.435 |
| CRP within 24h | 4.10 (2.55 to 10.55) | 8.50 (4.20 to 30.20) | 0.053 |
| CRP on the third day | 6.60 (3.05 to 21.05) | 17.20 (4.80 to 53.50) | 0.144 |
| CRP on the fifth day | 8.45 (3.03 to 23.98) | 20.20 (4.00 to 66.50) | 0.247 |

Data are described as the median and interquartile range (P25 to P75). Abbreviations: NIHSS, National Institutes of Health Stroke Scale; NSE, neuron-specific enolase; S100 β , S100 β protein; IL-6, interleukin 6; BDNF, serum brain-derived neurotrophic factor; CRP, C reactive protein.

Table 7 – Comparison of the values of serum biomarkers between patients with mRS ≤ 3 vs mRS > 3 .

| Biomarker | mRS ≤ 3 | mRS > 3 | <i>p</i> |
|-------------------------------|----------------------------|-----------------------------|----------|
| | at discharge (n=42) | at discharge (n=15) | |
| NSE within 24h | 3.17 (1.50 to 5.94) | 4.07 (2.02 to 21.09) | 0.425 |
| NSE on the third day | 3.12 (1.64 to 6.22) | 3.86 (1.73 to 20.34) | 0.364 |
| NSE on the fifth day | 3.26 (1.76 to 6.88) | 4.02 (2.61 to 18.82) | 0.167 |
| S100 β within 24h | 35.58 (14.16 to 65.81) | 139.24 (73.90 to 435.95) | <0.001 |
| S100 β on the third day | 36.17 (17.35 to 96.56) | 263.48 (56.16 to 589.24) | 0.001 |
| S100 β on the fifth day | 46.36 (14.67 to 100.39) | 117.34 (50.66 to 378.87) | 0.008 |
| IL-6 within 24h | 10.04 (4.17 to 15.70) | 17.81 (9.42 to 49.29) | 0.036 |
| IL-6 on the third day | 8.60 (4.80 to 23.39) | 27.55 (8.11 to 154.44) | 0.011 |
| IL-6 on the fifth day | 11.73 (5.69 to 23.33) | 33.40 (12.03 to 86.62) | 0.003 |
| BDNF within 24h | 24.51 (15.03 to 30.92) | 27.75 (15.87 to 34.60) | 0.807 |
| BDNF on the third day | 23.24 (16.18 to 31.21) | 23.91 (15.72 to 30.25) | 0.880 |
| BDNF on the fifth day | 23.03 (15.53 to 30.87) | 20.20 (13.25 to 27.35) | 0.621 |
| CRP within 24h | 4.70 (2.60 to 12.60) | 7.10 (4.80 to 26.40) | 0.073 |
| CRP on the third day | 6.80 (3.25 to 23.15) | 15.05 (5.33 to 106.23) | 0.082 |
| CRP on the fifth day | 8.95 (3.03 to 25.03) | 21.20 (4.83 to 109.65) | 0.117 |

Data are described as the median and interquartile range (P25 to P75). Abbreviations: mRS, modified Rankin scale; NSE, neuron-specific enolase; S100 β , S100 β protein; IL-6, interleukin 6; BDNF, serum brain-derived neurotrophic factor; CRP, C reactive protein.

Table 8 – Correlation matrix between biomarkers and length of hospital stay, n=57.

| Biomarker | Length of stay |
|--|-----------------------|
| NSE within 24h | -0.10 (0.444) |
| NSE on the third day ^a | -0.09 (0.496) |
| NSE on the fifth day ^b | -0.07 (0.604) |
| S100 β within 24h | 0.05 (0.692) |
| S100 β on the third day ^a | 0.23 (0.095) |
| S100 β on the fifth day ^b | 0.04 (0.788) |
| IL-6 within 24h | 0.24 (0.074) |
| IL-6 on the third day ^a | 0.22 (0.107) |
| IL-6 on the fifth day ^b | 0.23 (0.109) |
| BDNF within 24h | -0.05 (0.727) |
| BDNF on the third day ^a | -0.19 (0.163) |
| BDNF on the fifth day ^b | -0.23 (0.104) |
| CRP within 24h | 0.47 (<0.001) |
| CRP on the third day ^a | 0.41 (0.001) |
| CRP on the fifth day ^b | 0.25 (0.071) |

Data represent Spearman's rank correlation coefficient (p value). Abbreviations: NSE, neuron-specific enolase; S100 β , S100 β protein; IL-6, interleukin 6; BDNF, serum brain-derived neurotrophic factor; CRP, C reactive protein. ^an=56; ^bn=52.

Table 9 – Comparison of the values of serum biomarkers between patients with ischemic stroke vs hemorrhagic stroke.

| Biomarker | Ischemic stroke (n=50) | Hemorrhagic stroke (n=7) | p |
|------------------------|---|---|----------|
| NSE within 24h | 3.24 (1.50 to 6.19) | 3.86 (2.70 to 5.82) | 0.942 |
| NSE on the third day | 3.23 (1.64 to 6.93) | 3.15 ^a (1.78 to 5.49) | 0.711 |
| NSE on the fifth day | 3.63 ^b (2.06 to 8.13) | 3.15 ^a (1.57 to 5.64) | 0.456 |
| S100β within 24h | 48.86 (16.39 to 93.46) | 73.90 (29.39 to 150.03) | 0.331 |
| S100β on the third day | 46.10 (24.66 to 178.17) | 63.64 ^a (22.00 to 289.53) | 0.812 |
| S100β on the fifth day | 73.70 ^b (19.34 to 121.15) | 70.21 ^a (17.09 to 108.58) | 0.830 |
| IL-6 within 24h | 10.63 (4.99 to 29.63) | 15.65 (7.91 to 63.95) | 0.285 |
| IL-6 on the third day | 9.70 (5.46 to 26.04) | 21.38 ^a (6.53 to 35.60) | 0.442 |
| IL-6 on the fifth day | 13.15 ^b (5.99 to 29.93) | 20.71 ^a (10.79 to 40.61) | 0.316 |
| BDNF within 24h | 25.05 (15.06 to 33.87) | 23.93 (15.87 to 27.31) | 0.610 |
| BDNF on the third day | 24.42 (16.18 to 31.44) | 20.00 ^a (15.60 to 26.11) | 0.368 |
| BDNF on the fifth day | 22.98 ^b (15.31 to 31.03) | 18.12 ^a (16.21 to 25.05) | 0.510 |
| CRP within 24h | 6.60 (2.65 to 14.30) | 4,20 (3.90 to 58.20) | 0.300 |
| CRP on the third day | 9.10 (3.45 to 20.90) | 36.60 ^a (2.30 to 94.55) | 0.275 |
| CRP on the fifth day | 9.30 ^b (3.15 to 25.03) | 35.90 ^a (4.15 to 70.38) | 0.277 |

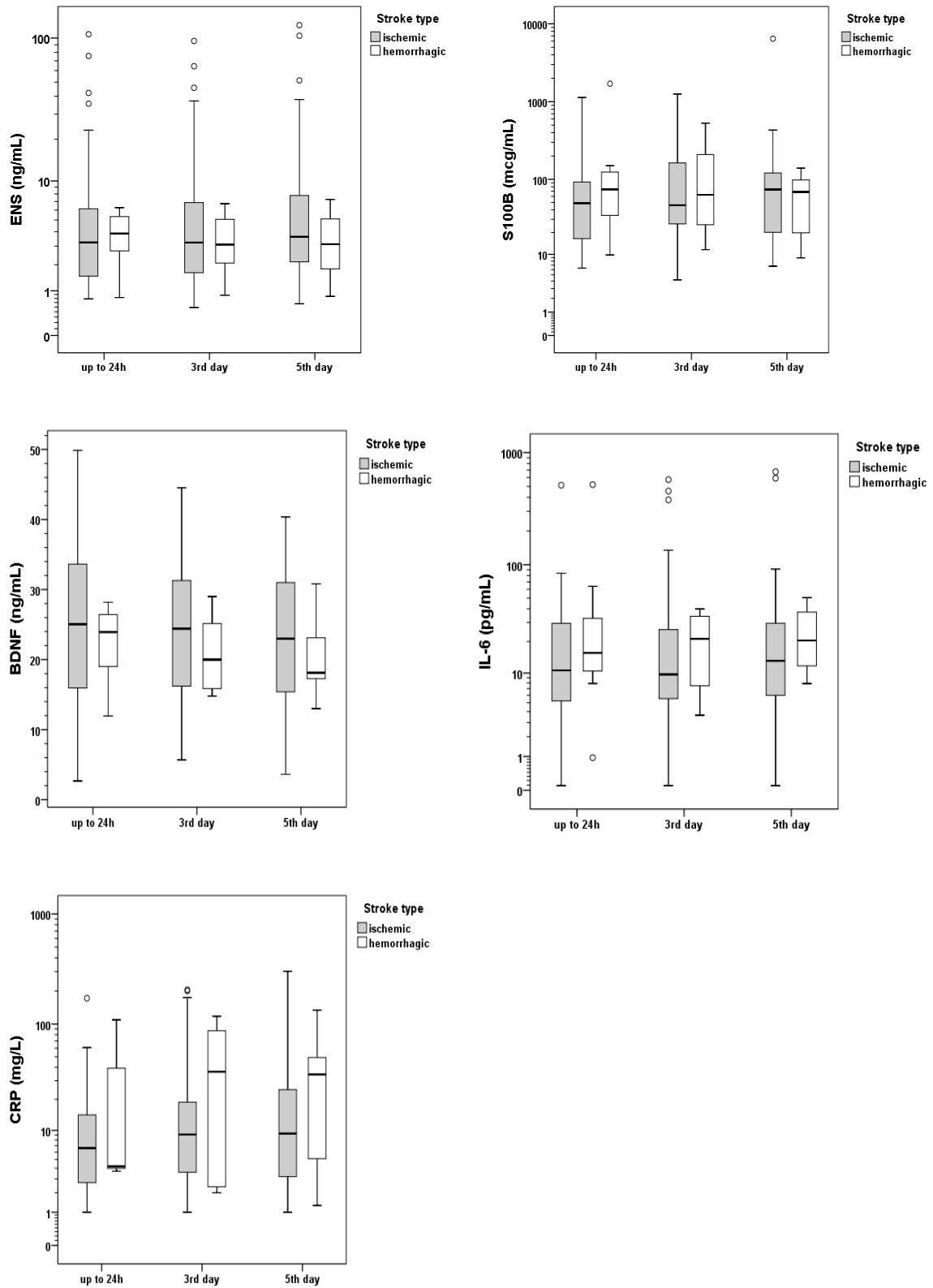
Data are described as the median and interquartile range (P25 to P75). Abbreviations: NSE, neuron-specific enolase; S100β, S100β protein; IL-6, interleukin 6; BDNF, serum brain-derived neurotrophic factor; CRP, C reactive protein. ^an=6; ^bn=46.

Table 10 – Correlation matrix between biomarkers and stroke scales NIHSS and mRS subdivided by stroke type.

| Biomarker | Ischemic stroke (n=50) | | Hemorrhagic stroke (n=7) | |
|------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | NIHSS at discharge | mRS at discharge | NIHSS at discharge | mRS at discharge |
| NSE within 24h | 0.16 (0.300) | 0.29 (0.044) | -0.54 (0.266) | -0.44 (0.328) |
| NSE on the third day | 0.15 (0.309) | 0.30 (0.037) | -0.60 ^a (0.208) | -0.62 ^a (0.191) |
| NSE on the fifth day | 0.22 ^b (0.160) | 0.33 ^b (0.026) | -0.60 ^a (0.208) | -0.62 ^a (0.191) |
| S100β within 24h | 0.20 (0.181) | 0.32 (0.022) | 0.37 (0.468) | 0.82 (0.024) |
| S100β on the third day | 0.48 (0.001) | 0.52 (<0.001) | -0.77 ^a (0.072) | -0.44 ^a (0.381) |
| S100β on the fifth day | 0.42 ^b (0.005) | 0.53 ^b (<0.001) | -0.71 ^a (0.111) | -0.53 ^a (0.280) |
| IL-6 within 24h | 0.36 (0.014) | 0.36 (0.010) | -0.49 (0.329) | -0.11 (0.816) |
| IL-6 on the third day | 0.50 (<0.001) | 0.56 (<0.001) | -0.54 ^a (0.266) | -0.44 ^a (0.381) |
| IL-6 on the fifth day | 0.51 ^b (<0.001) | 0.58 ^b (<0.001) | 0.26 ^a (0.623) | 0.27 ^a (0.612) |
| BDNF within 24h | 0.07 (0.626) | 0.07 (0.610) | 0.14 (0.787) | <0.001 (1.000) |
| BDNF on the third day | -0.02 (0.988) | 0.03 (0.813) | 0.09 ^a (0.872) | 0.09 ^a (0.868) |
| BDNF on the fifth day | -0.01 ^b (0.950) | -0.02 ^b (0.893) | -0.31 ^a (0.544) | -0.27 ^a (0.612) |
| CRP within 24h | 0.29 (0.043) | 0.31 (0.023) | -0.09 (0.872) | 0.06 (0.908) |
| CRP on the third day | 0.43 (0.002) | 0.54 (<0.001) | -0.60 ^a (0.208) | -0.62 ^a (0.191) |
| CRP on the fifth day | 0.36 ^b (0.016) | 0.48 ^b (0.001) | -0.49 ^a (0.329) | -0.53 ^a (0.280) |

Data represent Spearman's rank correlation coefficient (p value). Abbreviations: NIHSS, National Institutes of Health Stroke Scale; mRS, modified Rankin scale; NSE, neuron-specific enolase; S100β, S100β protein; IL-6, interleukin 6; BDNF, serum brain-derived neurotrophic factor; CRP, C reactive protein. ^an=6; ^bn=46.

Figure 1: Serum levels of biomarkers for patients with ischemic or hemorrhagic stroke throughout the observational period



8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados desse estudo mostraram boa associação de alguns dos marcadores selecionados com as escalas de AVC e com os desfechos durante o tempo de internação hospitalar.

Na avaliação da associação entre os biomarcadores e as escalas de AVC nas primeiras 24 horas, no terceiro dia e no quinto dia após o evento, houve correlação significativa entre: (1) a proteína S100 β e a escala mRS em todas as medidas, (2) a proteína S100 β e a escala do NIHSS no terceiro e no quinto dias, (3) a IL-6 e as escalas mRS e NIHSS no terceiro e no quinto dias, (4) a PCR e as escalas mRS e NIHSS nas primeiras 24 horas e no terceiro dia (tabela 1).

Ocorreu correlação significativa entre a proteína S100 β , a IL-6 e a PCR e a escala mRS na alta hospitalar, no terceiro e no quinto dias. Também houve significância estatística entre a escala do NIHSS na alta hospitalar e a proteína S100 β no terceiro dia e a IL-6 no terceiro e no quinto dias após o AVC (tabela 2).

Quando os pacientes foram divididos em dois grupos de acordo com a severidade e o grau de comprometimento funcional pelas escalas do NIHSS (NIHSS ≤ 6 e NIHSS > 6) e mRS (mRS ≤ 3 e mRS > 3), ambas as escalas neurológicas apresentaram boa correlação entre os desfechos favoráveis (NIHSS ≤ 6 e mRS < 3) na alta hospitalar e os marcadores S100 β e IL-6 em todas as mensurações (tabela 3).

As concentrações séricas da proteína S100 β nas primeiras 24 horas e no terceiro dia, bem como da IL-6 nas três medidas realizadas, foram significativamente maiores nos pacientes que apresentaram NIHSS > 6 na alta hospitalar (tabela 4). Além disso, os níveis séricos da S100 β e da IL-6 foram maiores nas três dosagens realizadas nos pacientes com mRS > 3 na alta hospitalar, demonstrando desfecho desfavorável (tabela 5).

Nesse trabalho, não foi encontrada forte correlação estatística entre as concentrações séricas dos biomarcadores e o tempo de internação hospitalar após o

AVC, havendo apenas uma tendência a maior tempo de hospitalização nos pacientes com níveis mais elevados de PCR nas primeiras 24 horas (tabela 6).

Também, não foram demonstradas diferenças significativas entre as concentrações dos marcadores séricos nas três mensurações após o diagnóstico de AVC isquêmico ou hemorrágico (tabela 7 e figura 2), apesar de uma tendência de melhor associação entre os biomarcadores e as escalas neurológicas (NIHSS e mRS) para o AVC isquêmico comparado ao AVC hemorrágico (tabela 8).

Durante o tempo de observação, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre as concentrações séricas de ENS e BDNF e as escalas de AVC usadas para avaliação de severidade e desfechos pós AVC.

Algumas limitações do estudo devem ser consideradas. O número de pacientes, a inclusão dos diferentes tipos de AVC e de diferentes abordagens de tratamento dificultaram uma análise mais detalhada. Os pacientes com infecções não foram excluídos, portanto parte da associação entre os marcadores inflamatórios (IL-6 e PCR) e os desfechos pode ter sido influenciada por esse fator. Foram usadas escalas de AVC para estimar a gravidade e os desfechos, mas estes escores não conseguem avaliar todos os déficits relacionados ao AVC. Além disso, nos escolhemos apenas um pequeno número de biomarcadores envolvidos na fisiopatologia do AVC, não sendo possível avaliar todas as fases e mecanismos dessa complexa doença.

Tabela 1 – Matriz de correlação entre biomarcadores séricos e as escalas de gravidade NIHSS e mRS do acidente vascular cerebral (AVC), n=57.

| Biomarcador | Até 24h | | Terceiro dia ^a | | Quinto dia ^b | |
|--------------|----------------------|----------------------|---------------------------|----------------------|-------------------------|----------------------|
| | NIHSS | mRS | NIHSS | mRS | NIHSS | mRS |
| ENS | 0,25 (0,060) | 0,25 (0,061) | 0,25 (0,064) | 0,24 (0,073) | 0,22 (0,110) | 0,26 (0,065) |
| S100 β | 0,35 (0,008) | 0,47 ($<0,001$) | 0,56 ($<0,001$) | 0,55 ($<0,001$) | 0,48 ($<0,001$) | 0,54 ($<0,001$) |
| IL-6 | 0,33 (0,014) | 0,29 (0,028) | 0,45 ($<0,001$) | 0,48 ($<0,001$) | 0,61 ($<0,001$) | 0,57 ($<0,001$) |
| BDNF | 0,09 (0,515) | 0,02 (0,866) | -0,10 (0,484) | -0,09 (0,527) | -0,10 (0,504) | -0,11 (0,452) |
| PCR | 0,48 ($<0,001$) | 0,46 ($<0,001$) | 0,46 ($<0,001$) | 0,47 ($<0,001$) | 0,41 (0,002) | 0,364 (0,007) |

Os dados apresentados representam o coeficiente de correlação de Spearman e sua significância estatística (em parênteses). Abreviações: NIHSS, escala de AVC do *National Institutes of Health*; mRS, escala de Rankin modificada; ENS, enolase neurônio específica; S100 β , proteína S100 β ; IL-6, interleucina 6; BDNF, fator neurotrófico derivado do cérebro; PCR, proteína C reativa. ^an=56; ^bn=52.

Tabela 2 – Matriz de correlação entre biomarcadores séricos e as escalas de gravidade NIHSS e mRS do acidente vascular cerebral (AVC) na alta, n=57.

| Biomarcador | NIHSS na alta | mRS na alta |
|------------------------------------|--------------------------|------------------------|
| ENS nas primeiras 24h | 0,11 (0,429) | 0,23 (0,091) |
| ENS no terceiro dia ^a | 0,11 (0,449) | 0,23 (0,090) |
| ENS no quinto dia ^b | 0,15 (0,291) | 0,25 (0,081) |
| S100β nas primeiras 24h | 0,22 (0,106) | 0,39 (0,002) |
| S100β no terceiro dia ^a | 0,41 (0,002) | 0,46 ($<0,001$) |
| S100β no quinto dia ^b | 0,35 (0,015) | 0,45 (0,001) |
| IL-6 nas primeiras 24h | 0,31 (0,023) | 0,34 (0,010) |
| IL-6 no terceiro dia ^a | 0,44 (0,001) | 0,50 ($<0,001$) |
| IL-6 no quinto dia ^b | 0,52 ($<0,001$) | 0,59 ($<0,001$) |
| BDNF nas primeiras 24h | 0,06 (0,696) | 0,06 (0,685) |
| BDNF no terceiro dia ^a | -0,03 (0,831) | 0,01 (0,932) |
| BDNF no quinto dia ^b | -0,05 (0,747) | -0,05 (0,717) |
| PCR nas primeiras 24h | 0,27 (0,042) | 0,32 (0,014) |
| PCR no terceiro dia ^a | 0,36 (0,007) | 0,44 (0,001) |
| PCR no quinto dia ^b | 0,31 (0,026) | 0,41 (0,002) |

Os dados apresentados representam o coeficiente de correlação de Spearman e sua significância estatística (em parênteses). Abreviações: NIHSS, escala de AVC do *National Institutes of Health*; mRS, escala de Rankin modificada; ENS, enolase neurônio específica; S100β, proteína S100β; IL-6, interleucina 6; BDNF, fator neurotrófico derivado do cérebro; PCR, proteína C reativa. ^an=56; ^bn=52.

Tabela 3 – Valores para a área da curva ROC dos biomarcadores séricos na predição de bom desfecho pelas escalas de gravidade NIHSS e mRS do acidente vascular cerebral (AVC), n=57.

| Biomarcador | NIHSS ≤ 6 na alta | mRS ≤ 3 na alta |
|------------------------------------|------------------------------|----------------------------|
| ENS nas primeiras 24h | 0,50 (0,30 a 0,69) | 0,56 (0,36 a 0,76) |
| ENS no terceiro dia ^a | 0,49 (0,30 a 0,68) | 0,58 (0,39 a 0,76) |
| ENS no quinto dia ^b | 0,55 (0,37 a 0,72) | 0,63 (0,45 a 0,80) |
| S100β nas primeiras 24h | 0,70 (0,54 a 0,86) | 0,81 (0,65 a 0,96) |
| S100β no terceiro dia ^a | 0,73 (0,57 a 0,89) | 0,78 (0,62 a 0,94) |
| S100β no quinto dia ^b | 0,67 (0,50 a 0,85) | 0,74 (0,58 a 0,90) |
| IL-6 nas primeiras 24h | 0,69 (0,52 a 0,86) | 0,66 (0,49 a 0,83) |
| IL-6 no terceiro dia ^a | 0,71 (0,56 a 0,86) | 0,72 (0,56 a 0,88) |
| IL-6 no quinto dia ^b | 0,78 (0,64 a 0,92) | 0,77 (0,62 a 0,92) |
| BDNF nas primeiras 24h | 0,47 (0,28 a 0,67) | 0,53 (0,34 a 0,72) |
| BDNF no terceiro dia ^a | 0,42 (0,23 a 0,61) | 0,50 (0,32 a 0,68) |
| BDNF no quinto dia ^b | 0,43 (0,24 a 0,62) | 0,46 (0,27 a 0,64) |
| PCR nas primeiras 24h | 0,64 (0,48 a 0,80) | 0,61 (0,46 a 0,77) |
| PCR no terceiro dia ^a | 0,59 (0,42 a 0,77) | 0,63 (0,45 a 0,80) |
| PCR no quinto dia ^b | 0,60 (0,42 a 0,78) | 0,64 (0,46 a 0,82) |

Os dados apresentados representam a área da curva ROC (*Receiver Operating Characteristics*) e seu intervalo de confiança de 95% (em parênteses). Abreviações: NIHSS, escala de AVC do *National Institutes of Health*; mRS, escala de Rankin modificada; ENS, enolase neurônio específica; S100β, proteína S100β; IL-6, interleucina 6; BDNF, fator neurotrófico derivado do cérebro; PCR, proteína C reativa. ^an=56; ^bn=52.

Tabela 4 – Comparação dos valores dos biomarcadores séricos entre os pacientes com NIHSS ≤ 6 vs NIHSS > 6.

| Biomarcador | NIHSS ≤ 6 na alta (n=41) | NIHSS > 6 na alta (n=15) | p |
|-------------------------|-------------------------------------|--|----------|
| ENS nas primeiras 24h | 3,20 (1,45 a 5,94) | 3,14 (1,51 a 11,83) | 0,953 |
| ENS no terceiro dia | 3,17 (1,64 a 6,74) | 2,57 (1,54 a 13,40) | 0,945 |
| ENS no quinto dia | 3,41 (1,76 a 7,28) | 3,61 (1,85 a 13,69) | 0,618 |
| S100β nas primeiras 24h | 34,56 (12,83 a 68,28) | 73,90 (36,01 a 150,03) | 0,013 |
| S100β no terceiro dia | 35,88 (16,22 a 88,64) | 162,93 (54,84 a 331,42) | 0,007 |
| S100β no quinto dia | 41,75 (14,67 a 92,59) | 81,18 (38,13 a 185,64) | 0,055 |
| IL-6 nas primeiras 24h | 9,71 (3,81 a 14,76) | 15,86 (9,02 a 40,86) | 0,038 |
| IL-6 no terceiro dia | 7,82 (3,85 a 20,10) | 20,83 (8,32 a 33,03) | 0,015 |
| IL-6 no quinto dia | 10,81 (4,62 a 17,86) | 29,51 (12,11 a 38,13) | 0,002 |
| BDNF nas primeiras 24h | 25,05 (17,36 a 30,92) | 24,47 (9,78 a 35,59) | 0,790 |
| BDNF no terceiro dia | 24,79 (16,51 a 31,21) | 22,18 (11,87 a 33,52) | 0,465 |
| BDNF no quinto dia | 23,23 (15,66 a 31,03) | 20,93 (12,93 a 28,09) | 0,435 |
| PCR nas primeiras 24h | 4,10 (2,55 a 10,55) | 8,50 (4,20 a 30,20) | 0,053 |
| PCR no terceiro dia | 6,60 (3,05 a 21,05) | 17,20 (4,80 a 53,50) | 0,144 |
| PCR no quinto dia | 8,45 (3,03 a 23,98) | 20,20 (4,00 a 66,50) | 0,247 |

Os dados são apresentados como mediana e amplitude interquartil (P25 a P75). Abreviações: NIHSS, escala de AVC do *National Institutes of Health*; ENS, enolase neurônio específica; S100β, proteína S100β; IL-6, interleucina 6; BDNF, fator neurotrófico derivado do cérebro; PCR, proteína C reativa.

Tabela 5 – Comparação dos valores dos biomarcadores séricos entre os pacientes com mRS ≤ 3 vs mRS > 3 .

| Biomarcador | mRS ≤ 3 na alta (n=42) | mRS > 3 na alta (n=15) | p |
|--------------------------------|---|---|----------|
| ENS nas primeiras 24h | 3,17 (1,50 a 5,94) | 4,07 (2,02 a 21,09) | 0,425 |
| ENS no terceiro dia | 3,12 (1,64 a 6,22) | 3,86 (1,73 a 20,34) | 0,364 |
| ENS no quinto dia | 3,26 (1,76 a 6,88) | 4,02 (2,61 a 18,82) | 0,167 |
| S100 β nas primeiras 24h | 35,58 (14,16 a 65,81) | 139,24 (73,90 a 435,95) | <0,001 |
| S100 β no terceiro dia | 36,17 (17,35 a 96,56) | 263,48 (56,16 a 589,24) | 0,001 |
| S100 β no quinto dia | 46,36 (14,67 a 100,39) | 117,34 (50,66 a 378,87) | 0,008 |
| IL-6 nas primeiras 24h | 10,04 (4,17 a 15,70) | 17,81 (9,42 a 49,29) | 0,036 |
| IL-6 no terceiro dia | 8,60 (4,80 a 23,39) | 27,55 (8,11 a 154,44) | 0,011 |
| IL-6 no quinto dia | 11,73 (5,69 a 23,33) | 33,40 (12,03 a 86,62) | 0,003 |
| BDNF nas primeiras 24h | 24,51 (15,03 a 30,92) | 27,75 (15,87 a 34,60) | 0,807 |
| BDNF no terceiro dia | 23,24 (16,18 a 31,21) | 23,91 (15,72 a 30,25) | 0,880 |
| BDNF no quinto dia | 23,03 (15,53 a 30,87) | 20,20 (13,25 a 27,35) | 0,621 |
| PCR nas primeiras 24h | 4,70 (2,60 a 12,60) | 7,10 (4,80 a 26,40) | 0,073 |
| PCR no terceiro dia | 6,80 (3,25 a 23,15) | 15,05 (5,33 a 106,23) | 0,082 |
| PCR no quinto dia | 8,95 (3,03 a 25,03) | 21,20 (4,83 a 109,65) | 0,117 |

Os dados são apresentados como mediana e amplitude interquartil (P25 a P75). Abreviações: mRS, escala de Rankin modificada; ENS, enolase neurônio específica; S100 β , proteína S100 β ; IL-6, interleucina 6; BDNF, fator neurotrófico derivado do cérebro; PCR, proteína C reativa.

Tabela 6 – Matriz de correlação entre os biomarcadores séricos e o tempo de internação hospitalar, n=57.

| Biomarcador | Tempo de internação |
|------------------------------------|----------------------------|
| ENS nas primeiras 24h | -0,10 (0,444) |
| ENS no terceiro dia ^a | -0,09 (0,496) |
| ENS no quinto dia ^b | -0,07 (0,604) |
| S100β nas primeiras 24h | 0,05 (0,692) |
| S100β no terceiro dia ^a | 0,23 (0,095) |
| S100β no quinto dia ^b | 0,04 (0,788) |
| IL-6 nas primeiras 24h | 0,24 (0,074) |
| IL-6 no terceiro dia ^a | 0,22 (0,107) |
| IL-6 no quinto dia ^b | 0,23 (0,109) |
| BDNF nas primeiras 24h | -0,05 (0,727) |
| BDNF no terceiro dia ^a | -0,19 (0,163) |
| BDNF no quinto dia ^b | -0,23 (0,104) |
| PCR nas primeiras 24h | 0,47 (<0,001) |
| PCR no terceiro dia ^a | 0,41 (0,001) |
| PCR no quinto dia ^b | 0,25 (0,071) |

Os dados representam o coeficiente de correlação de Spearman e sua significância estatística (em parênteses). Abreviações: ENS, enolase neurônio específica; S100β, proteína S100β; IL-6, interleucina 6; BDNF, fator neurotrófico derivado do cérebro; PCR, proteína C reativa. ^an=56; ^bn=52.

Tabela 7 – Comparação dos valores dos biomarcadores séricos entre os pacientes com AVC isquêmico vs AVC hemorrágico.

| Biomarcador | AVC isquêmico (n=50) | AVC hemorrágico (n=7) | p |
|-------------------------|--|--|----------|
| ENS nas primeiras 24h | 3,24 (1,50 a 6,19) | 3,86 (2,70 a 5,82) | 0,942 |
| ENS no terceiro dia | 3,23 (1,64 a 6,93) | 3,15 ^a (1,78 a 5,49) | 0,711 |
| ENS no quinto dia | 3,63 ^b (2,06 a 8,13) | 3,15 ^a (1,57 a 5,64) | 0,456 |
| S100β nas primeiras 24h | 48,86 (16,39 a 93,46) | 73,90 (29,39 a 150,03) | 0,331 |
| S100β no terceiro dia | 46,10 (24,66 a 178,17) | 63,64 ^a (22,00 a 289,53) | 0,812 |
| S100β no quinto dia | 73,70 ^b (19,34 a 121,15) | 70,21 ^a (17,09 a 108,58) | 0,830 |
| IL-6 nas primeiras 24h | 10,63 (4,99 a 29,63) | 15,65 (7,91 a 63,95) | 0,285 |
| IL-6 no terceiro dia | 9,70 (5,46 a 26,04) | 21,38 ^a (6,53 a 35,60) | 0,442 |
| IL-6 no quinto dia | 13,15 ^b (5,99 a 29,93) | 20,71 ^a (10,79 a 40,61) | 0,316 |
| BDNF nas primeiras 24h | 25,05 (15,06 a 33,87) | 23,93 (15,87 a 27,31) | 0,610 |
| BDNF no terceiro dia | 24,42 (16,18 a 31,44) | 20,00 ^a (15,60 a 26,11) | 0,368 |
| BDNF no quinto dia | 22,98 ^b (15,31 a 31,03) | 18,12 ^a (16,21 a 25,05) | 0,510 |
| PCR nas primeiras 24h | 6,60 (2,65 a 14,30) | 4,20 (3,90 a 58,20) | 0,300 |
| PCR no terceiro dia | 9,10 (3,45 a 20,90) | 36,60 ^a (2,30 a 94,55) | 0,275 |
| PCR no quinto dia | 9,30 ^b (3,15 a 25,03) | 35,90 ^a (4,15 a 70,38) | 0,277 |

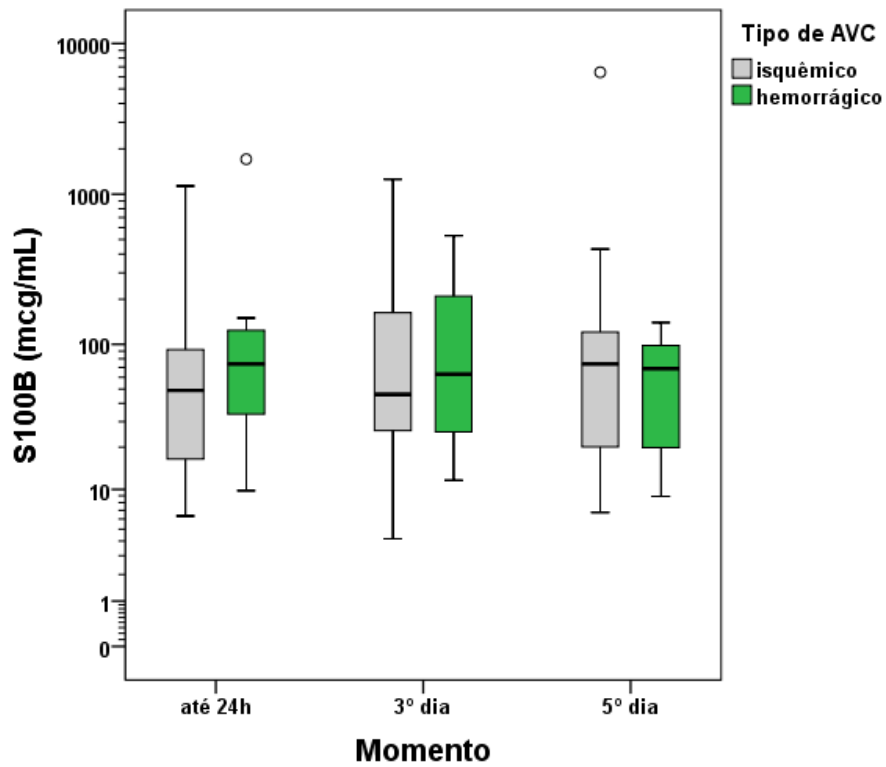
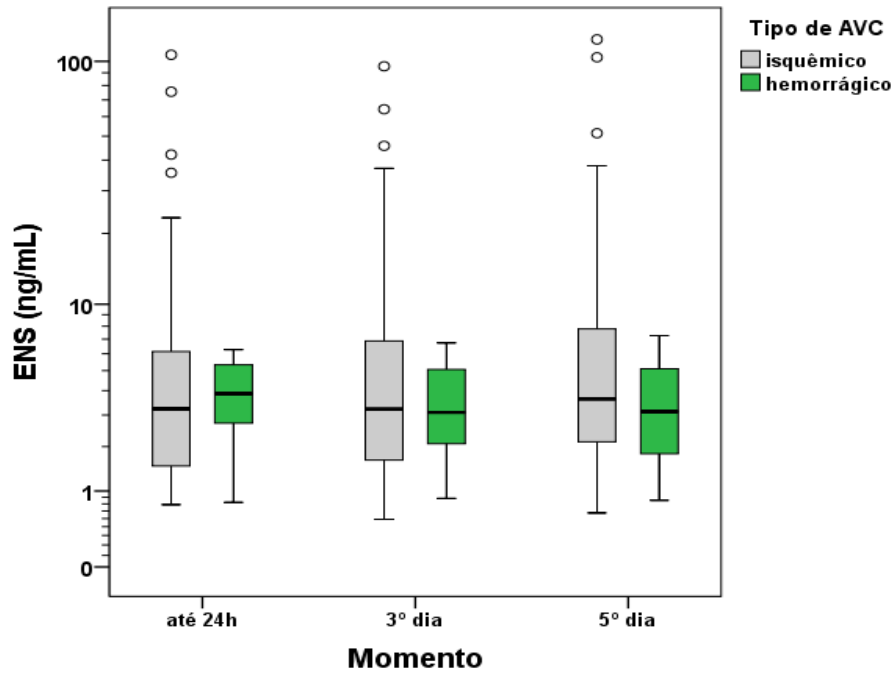
Os dados são apresentados como mediana e amplitude interquartil (P25 a P75). Abreviações: AVC, acidente vascular cerebral; ENS, enolase neurônio específica; S100β, proteína S100β; IL-6, interleucina 6; BDNF, fator neurotrófico derivado do cérebro; PCR, proteína C reativa. ^an=6; ^bn=46.

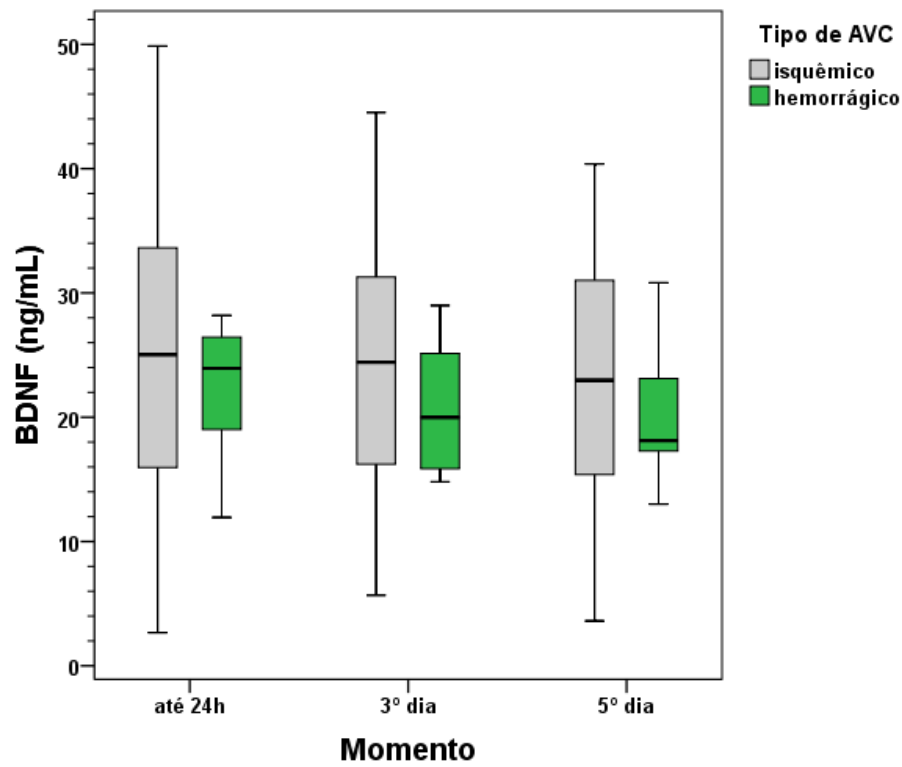
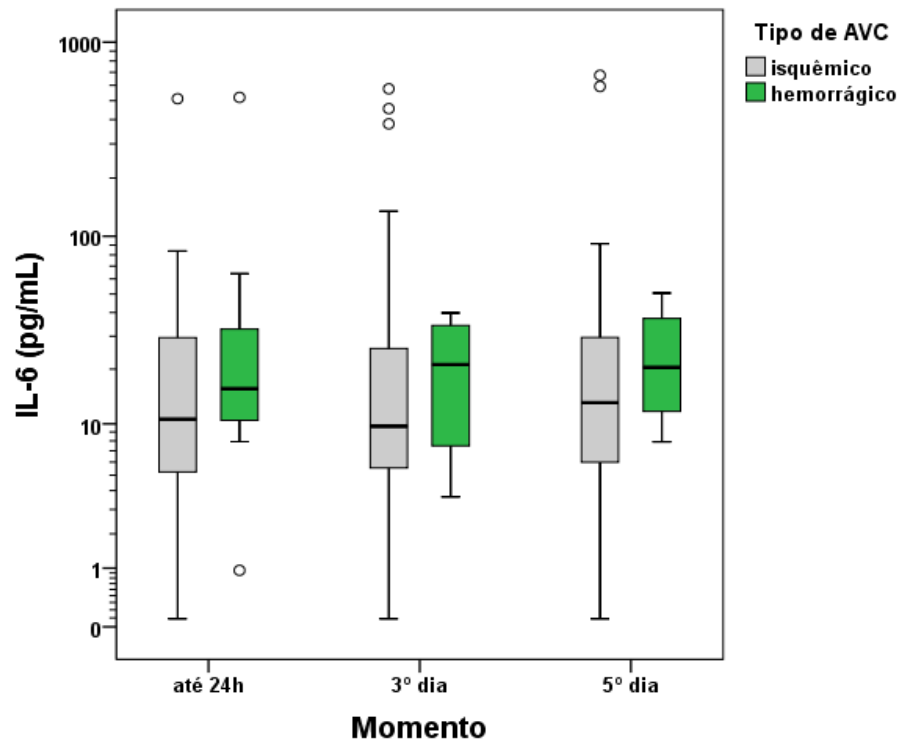
Tabela 8 – Matriz de correlação entre biomarcadores séricos e as escalas de gravidade NIHSS e mRS do acidente vascular cerebral (AVC) estratificada por tipo de AVC.

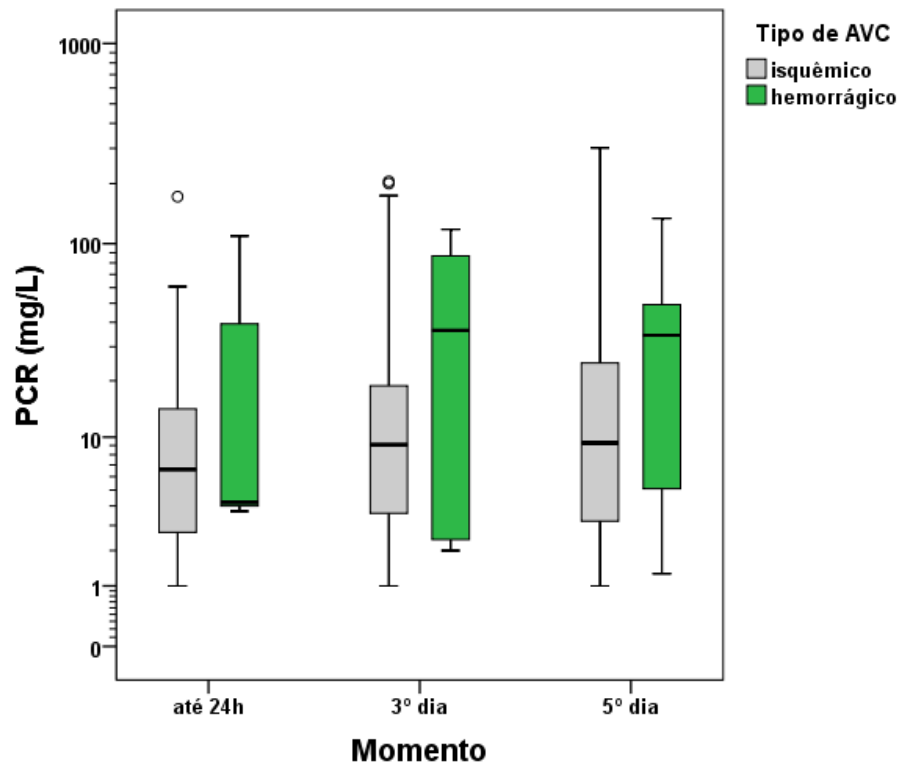
| Biomarcador | AVC isquêmico (n=50) | | AVC hemorrágico (n=7) | |
|-------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | NIHSS na alta | mRS na alta | NIHSS na alta | mRS na alta |
| ENS nas primeiras 24h | 0,16 (0,300) | 0,29 (0,044) | -0,54 (0,266) | -0,44 (0,328) |
| ENS no terceiro dia | 0,15 (0,309) | 0,30 (0,037) | -0,60 ^a (0,208) | -0,62 ^a (0,191) |
| ENS no quinto dia | 0,22 ^b (0,160) | 0,33 ^b (0,026) | -0,60 ^a (0,208) | -0,62 ^a (0,191) |
| S100β nas primeiras 24h | 0,20 (0,181) | 0,32 (0,022) | 0,37 (0,468) | 0,82 (0,024) |
| S100β no terceiro dia | 0,48 (0,001) | 0,52 ($<0,001$) | -0,77 ^a (0,072) | -0,44 ^a (0,381) |
| S100β no quinto dia | 0,42 ^b (0,005) | 0,53 ^b ($<0,001$) | -0,71 ^a (0,111) | -0,53 ^a (0,280) |
| IL-6 nas primeiras 24h | 0,36 (0,014) | 0,36 (0,010) | -0,49 (0,329) | -0,11 (0,816) |
| IL-6 no terceiro dia | 0,50 ($<0,001$) | 0,56 ($<0,001$) | -0,54 ^a (0,266) | -0,44 ^a (0,381) |
| IL-6 no quinto dia | 0,51 ^b ($<0,001$) | 0,58 ^b ($<0,001$) | 0,26 ^a (0,623) | 0,27 ^a (0,612) |
| BDNF nas primeiras 24h | 0,07 (0,626) | 0,07 (0,610) | 0,14 (0,787) | $<0,001$ (1,000) |
| BDNF no terceiro dia | -0,02 (0,988) | 0,03 (0,813) | 0,09 ^a (0,872) | 0,09 ^a (0,868) |
| BDNF no quinto dia | -0,01 ^b (0,950) | -0,02 ^b (0,893) | -0,31 ^a (0,544) | -0,27 ^a (0,612) |
| PCR nas primeiras 24h | 0,29 (0,043) | 0,31 (0,023) | -0,09 (0,872) | 0,06 (0,908) |
| PCR no terceiro dia | 0,43 (0,002) | 0,54 ($<0,001$) | -0,60 ^a (0,208) | -0,62 ^a (0,191) |
| PCR no quinto dia | 0,36 ^b (0,016) | 0,48 ^b (0,001) | -0,49 ^a (0,329) | -0,53 ^a (0,280) |

Os dados apresentados representam o coeficiente de correlação de Spearman e sua significância estatística (em parênteses). Abreviações: NIHSS, escala de AVC do *National Institutes of Health*; mRS, escala de Rankin modificada; ENS, enolase neurônio específica; S100β, proteína S100β; IL-6, interleucina 6; BDNF, fator neurotrófico derivado do cérebro; PCR, proteína C reativa.
^an=6; ^bn=46.

Figura 2: Gráfico de Box-plot representando os valores dos biomarcadores entre os paciente com AVC isquêmico ou hemorrágico ao longo do período de observação







9. PERSPECTIVAS FUTURAS

A literatura atual sugere que o uso de biomarcadores séricos, escolhidos dentre os envolvidos nos diferentes mecanismos da fisiopatologia do AVC, apresenta importância fundamental na monitorização e na avaliação prognóstica. Porém, são necessários mais estudos para a identificação do painel ideal de biomarcadores séricos que apresente melhor correlação com a evolução neurológica após o AVC e do melhor momento da dosagem dos marcadores selecionados. Além disso, os trabalhos realizados até o momento indicam a necessidade de individualização dos biomarcadores para os diferentes tipos de AVC (isquêmico e hemorrágico), em função das diferenças fisiopatológicas intracerebrais ainda não totalmente esclarecidas.

Um painel de biomarcadores sensível e específico, que apresente boa correlação com as escalas de gravidade e prognóstico do AVC, poderá auxiliar no atendimento dos pacientes após o evento agudo na definição dos tratamentos, na redução da necessidade de exames de imagem sequenciais e, acima de tudo, na programação e orientação das medidas de reabilitação. A longo prazo, o aumento da capacidade preditiva dos desfechos após o AVC poderá melhorar o prognóstico dos pacientes pela otimização do tratamento e reduzir os custos relacionados à doença.

10. ANEXOS

10.1 NIHSS - *National Institutes of Health Stroke Scale*

NIH STROKE SCALE

Identificação do Paciente

Nome: _____

Registro: _____

Exame inicial: Data ____/____/____

| Instrução | Definição da escala | Score | Hora |
|---|--|---|---|
| <p>1a. Nível de Consciência 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>1b. Perguntas de Nível de Consciência 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>1c. Comandos de Nível de Consciência 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>2. Melhor olhar conjugado 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 score 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 score 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>3. Visual 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>4. Paralisia Facial 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>5. Motor para braços 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>6. Motor para pernas 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>7. Ataxia de membros 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 calcânhar-jelho 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>8. Sensibilidade 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 uma 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>9. Melhor linguagem 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> |

| Instrução | Definição da escala | Escore | Hora |
|--|--|----------------------------------|----------------------------------|
| 10. Disartria Se acredita que o paciente é normal, uma avaliação mais adequada é obtida, pedindo-se ao paciente que leia ou repita palavras da lista anexa. Se o paciente tem afasia grave, a clareza da articulação da fala espontânea pode ser graduada. Somente se o paciente estiver intubado ou tiver outras barreiras físicas a produção da fala, este item deverá ser considerado não testável (NT). Não diga ao paciente por que ele está sendo testado. | 0 = Normal. 1 = Disartria leve a moderada; paciente arrasta pelo menos algumas palavras, e na pior das hipóteses, pode ser entendido, com alguma dificuldade. 2 = Disartria grave; fala do paciente é tão empastada que chega a ser ininteligível, na ausência de disfasia ou com disfasia desproporcional, ou é mudo/anártrico. NT = Intubado ou outra barreira física; explique____ | _____ _____ _____ _____ | _____ _____ _____ _____ |
| 11. Extinção ou Desatenção (antiga negligência) Informação suficiente para a identificação de negligência pode ter sido obtida durante os testes anteriores. Se o paciente tem perda visual grave, que impede o teste da estimulação visual dupla simultânea, e os estímulos cutâneos são normais, o escore é normal. Se o paciente tem afasia, mas parece atentar para ambos os lados, o escore é normal. A presença de negligência espacial visual ou anosagnosia pode também ser considerada como evidência de negligência. Como a anormalidade só é pontuada se presente, o item nunca é considerado não testável. | 0 = Nenhuma anormalidade. 1 = Desatenção visual, tátil, auditiva, espacial ou pessoal, ou extinção à estimulação simultânea em uma das modalidades sensoriais. 2 = Profunda hemi-desatenção ou hemi-desatenção para mais de uma modalidade; não reconhece a própria mão e se orienta somente para um lado do espaço. | _____ _____ _____ _____ | _____ _____ _____ _____ |

TABELA DE EVOLUÇÃO

| DATA | HORA | ESCORE | EXAMINADOR |
|------|------|--------|------------|
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |

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

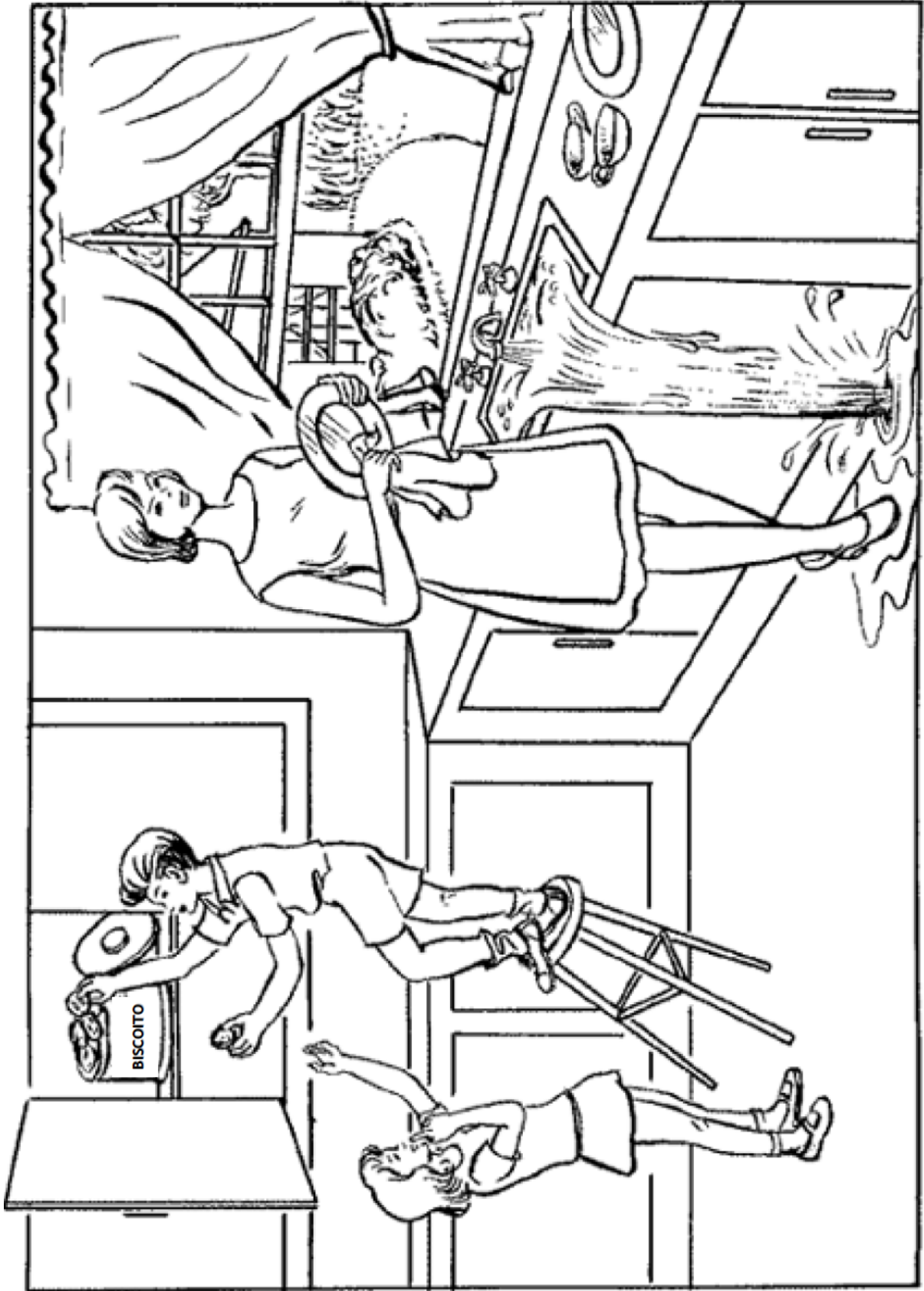


Figura para o item 9. Melhor linguagem

10.2 mRS - *modified Rankin Scale*

ESCALA DE RANKIN

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

10.3 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, NSE, proteína S100 β , BDNF, 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 2^a a 6^a feiras das 8h às 17h: (51) 33597640 /
(51) 33598340