

GUSTAVO GUIMARÃES PROTTI

AVALIAÇÃO DAS INTERLEUCINAS 1-BETA, 2 E 10 COMO  
BIOMARCADORES DA FASE AGUDA DO ACIDENTE  
VASCULAR CEREBRAL ISQUÊMICO.

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação  
da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São  
Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências da  
Saúde, área de concentração em Medicina.*

SÃO PAULO  
2010

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

GUSTAVO GUIMARÃES PROTTI

AVALIAÇÃO DAS INTERLEUCINAS 1-BETA, 2 E 10 COMO  
BIOMARCADORES DA FASE AGUDA DO ACIDENTE  
VASCULAR CEREBRAL ISQUÊMICO.

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação  
da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São  
Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências da  
Saúde, área de concentração em Medicina.*

**ORIENTADOR:** PROF. DR. RUBENS JOSÉ GAGLIARDI

**CO-ORIENTADORA:** PROF. DRA. WILMA CARVALHO NEVES FORTE

SÃO PAULO

2010

**FICHA CATALOGRÁFICA**  
**Preparada pela Biblioteca Central da**  
**Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo**

Protti, Gustavo Guimarães

Avaliação das interleucinas 1- $\beta$ , 2 e 10 como biomarcadores da fase aguda do acidente vascular cerebral isquêmico./ Gustavo Guimarães Protti. São Paulo, 2010.

Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo – Curso de Pós-Graduação em Medicina.

Área de Concentração: Ciências da Saúde

Orientador: Rubens José Gagliardi

Co-Orientador: Wilma Carvalho Neves Forte

1. Acidente vascular cerebral/ imunologia 2. Doença aguda 3. Interleucina-1. 4. Interleucina-2 5. Interleucina-10

BC-FCMSCSP/25-10

Trabalho realizado na Disciplina de Neurologia da Santa Casa de São Paulo, no Pronto-Socorro do Hospital Central da Santa Casa de São Paulo e no Laboratório de Imunologia da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo (FCMSCSP), com auxílio financeiro do Fundo de Apoio à Pesquisa da FCMSCSP (FAP) e CAPES.

“Não basta ensinar ao homem uma especialidade, porque se tornará assim uma máquina utilizável e não uma personalidade. É necessário que adquira um sentimento, um senso prático daquilo que vale a pena ser compreendido, daquilo que é belo, do que é moralmente correto.”

Albert Einstein

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais, exemplos de determinação.

Claro, à minha esposa.

## **AGRADECIMENTOS**

À Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo (FCMSCSP).

À Irmandade da Santa Casa de São Paulo.

À Disciplina de Neurologia da FCMSCSP, pela formação médica que me possibilitou atingir esta etapa profissional.

Ao Serviço de Emergências da Santa Casa de São Paulo, onde os pacientes foram captados.

Ao Prof. Dr. Rubens José Gagliardi, pela orientação, incentivo e desenvolvimento profissional que tem me proporcionado desde que ingressei na Santa Casa.

À Prof. Dra. Wilma Carvalho Neves Forte, co-orientadora.

À Profa. Dra Sandra Regina S. Sprovieri, quem admiro como pessoa e profissional, pela valiosa contribuição.

Às técnicas do Laboratório da Disciplina de Imunologia (Departamento de Patologia) da FCMSCSP, pelo auxílio nas dosagens das interleucinas.

Ao estatístico Euro de Barros Couto Junior, pelo auxílio na análise dos dados.

À CAPES e ao Fundo de Amparo à Pesquisa pelo apoio financeiro que viabilizou o projeto.

## ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AIT	Ataque isquêmico transitório
AVC	Acidente vascular cerebral
CINC	“Cytokine induced neutrophil chemoattractant”
ELISA	“Enzyme Linked Immunosorbent Assay”
FNkB	Fator nuclear <i>kappa</i> -B
EROS	Espécies reativas de oxigênio
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HSP65/60	Proteína de choque térmico 65/60
IAM	Infarto agudo do miocárdio
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular 1
IFN	Interferon
IL	Interleucina
IL-1ra	Antagonista do receptor para interleucina 1
IL-1RI	Receptores tipo 1 para interleucina 1
IL-1RII	Receptores tipo 2 para interleucina 1
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDLox	Lipoproteína de baixa densidade oxidada
LDLr	Receptor de lipoproteína de baixa densidade
LOX-1	Receptor lectina “like” para Lipoproteína de baixa densidade oxidada
LPS	Lipopolissacarídeo
MCP	Proteína quimiotática de macrófagos
M-CSF	Fator estimulador de crescimento de colônias de monócitos / macrófagos
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal
mL	mililitro
MMP	Metaloproteinase da matriz extracelular
mRS	“modified Rankin scale”
NIHSS	“National Institute of Health Stroke Scale”
NK	Célula “Natural Killer”
pg	picograma
RNA	Ácido ribonucléico
RNAm	Ácido ribonucléico mensageiro
RPM	Rotações por minuto
ScRs	Receptores do tipo “scavenger”
TGF	Fator transformador de crescimento de colônias
Th1	Linfócito T auxiliar tipo 1
Th2	Linfócito T auxiliar tipo 2
TLR	Receptores “Toll like”
TNF	Fator de necrose tumoral
TOAST	“Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment”
VCAM-1	Molécula de adesão da célula vascular 1



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>1.1. Revisão da Literatura</b> .....	2
1. <i>Aterosclerose e Inflamação</i> .....	2
2. <i>Resposta inflamatória do cérebro à agressão</i> .....	9
3. <i>Resposta inflamatória à agressão isquêmica</i> .....	10
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	17
<b>3. CASUÍSTICAS E MÉTODOS</b> .....	18
3.1. <i>Seleção dos pacientes</i> .....	18
3.2. <i>Casuística</i> .....	20
3.3. <i>Avaliação clínica e laboratorial</i> .....	23
3.4. <i>Ensaio imunológicos</i> .....	25
3.5. <i>Análise Estatística</i> .....	26
<b>4. RESULTADOS</b> .....	27
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	41
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	45
<b>7. ANEXOS</b> .....	46
<b>8. REFERÊNCIAS</b> .....	61
<b>FONTES CONSULTADAS</b> .....	69
<b>RESUMO</b> .....	70
<b>ABSTRACT</b> .....	71
<b>LISTAS E APÊNDICES</b> .....	72
<i>National Institute of Health Stroke Scale (NIHSS)</i> .....	72
<i>Modified Rankin Scale (mRS)</i> .....	73
<i>Classificação do AVC isquêmico – TOAST</i> .....	74
<i>Termo de Consentimento Livre e Esclarecido</i> .....	75
<i>Documento de aprovação do CEP</i> .....	76
<i>Kits OptEIA® (BD Biosciences®) para ensaio quantitativo (ELISA)</i> .....	77

## 1. INTRODUÇÃO

O acidente vascular cerebral (AVC) é atualmente a primeira causa de morte no Brasil<sup>1-4</sup> e a segunda nos países desenvolvidos<sup>5,6</sup>; é também a primeira causa de incapacidade funcional permanente<sup>6</sup> e assim caracteriza-se como uma doença de grande impacto em saúde pública. Cerca de 85% dos AVC têm origem isquêmica, do qual a aterosclerose dos grandes vasos representa a causa de um número significativo de casos (20%). Do restante, 25-30% são causados por doença em vasos penetrantes (lacunares) e 30% permanecem sem causa definida<sup>7</sup>.

A aterosclerose é uma doença progressiva que se inicia com o acúmulo subendotelial de macrófagos ricos em lipoproteínas de baixa densidade (LDL). A “estria gordurosa”, considerada lesão precursora da aterosclerose, é encontrada em cerca de 60% das aortas de fetos humanos gerados por mulheres sem hipercolesterolemia.<sup>8</sup> As artérias coronárias e cerebrais são acometidas respectivamente na segunda e terceira décadas de vida.<sup>9</sup> A aterosclerose permanece assintomática por vários anos e gradativamente evolui com espessamento da parede arterial decorrente do aumento de macrófagos ricos em LDL, infiltração de células linfomonocitárias e necrose, levando eventualmente à oclusão do leito arterial e conseqüente instalação das manifestações clínicas.<sup>10,11</sup>

No o sistema nervoso central, o tromboembolismo arterial a partir de placas de ateroma localizadas na porção extracraniana das artérias carótidas internas é uma causa comum de isquemia.<sup>12</sup> Entretanto, o risco anual de AVC isquêmico é extremamente variável, mesmo em nos casos de estenoses de alto grau (superior a 70% do diâmetro do vaso). De acordo com o estudo NASCET (1991), este risco neste grupo de doentes varia de 1-2% para indivíduos assintomáticos a até 13% para indivíduos com história de ataque isquêmico transitório (AIT) ou AVC recentes.<sup>13</sup>

Estas observações indicam que existem outros fatores, além do grau de estenose, relacionados ao risco de embolia. Alguns indivíduos com doença avançada são portadores de placas que exercem alto grau de estenose arterial e ainda assim permanecem assintomáticos. Outros indivíduos, apesar de apresentarem placas pequenas, com baixo grau de estenose e nenhum comprometimento hemodinâmico, podem ser mais susceptíveis ao desencadeamento do AVC.

Estas diferenças na susceptibilidade individual podem ser explicadas pelo conceito atual de aterosclerose.<sup>14,10,15-17</sup> No passado, o termo aterosclerose esteve relacionado à simples deposição de lipídios nas paredes dos vasos. Evidências posteriores confirmaram a atuação de mediadores inflamatórios em todos os estágios do processo aterotrombótico, ou seja, desde o recrutamento inicial dos leucócitos à eventual ruptura da placa de ateroma.<sup>10,11,15,16,18,19</sup> Deste modo, a aterosclerose é atualmente definida como “doença inflamatória” e a agressividade com que se manifesta pode estar relacionada com o grau de atividade inflamatória.

Este paradigma atual tem levado ao crescente interesse no estudo dos biomarcadores inflamatórios que, além de esclarecer os mecanismos de formação da placa aterosclerótica, permitirão o desenvolvimento de métodos para quantificar a inflamação e o risco de eventos isquêmicos recorrentes. Marcadores de isquemia cerebral ideais devem ter a capacidade de avaliar o prognóstico antes, durante e após a fase aguda e devem estar associados à extensão da isquemia, avaliada por exames radiológicos, anátomo-patológico e/ou quadro clínico.<sup>20</sup>

O quadro clínico do AVC na fase aguda é variável. Cerca de 31-37,5% dos casos de AVC evoluem com deterioração neurológica nas primeiras horas após a instalação.<sup>21,22</sup> Estas variações implicam em estratégias terapêuticas individualizadas, o que torna a avaliação do paciente um processo complexo e demorado. Por outro lado, o advento de novas intervenções terapêuticas para a fase aguda do AVC tem exigido maior rapidez e precisão no diagnóstico e avaliação da lesão isquêmica cerebral. Biomarcadores para o AVC isquêmico permitiriam identificar pacientes de maior e menor risco e assim individualizar a estratégia de tratamento e prevenção primária ou secundária.<sup>20,17</sup>

## **1.1. Revisão da Literatura**

### *1. Aterosclerose e Inflamação*

O aumento da concentração plasmática de LDL promove infiltração destas lipoproteínas na camada íntima da parede arterial à velocidade superior à capacidade de sua eliminação. Conseqüentemente estas lipoproteínas permanecem retidas na matriz extracelular, ponto de partida para a aterosclerose.<sup>15</sup>

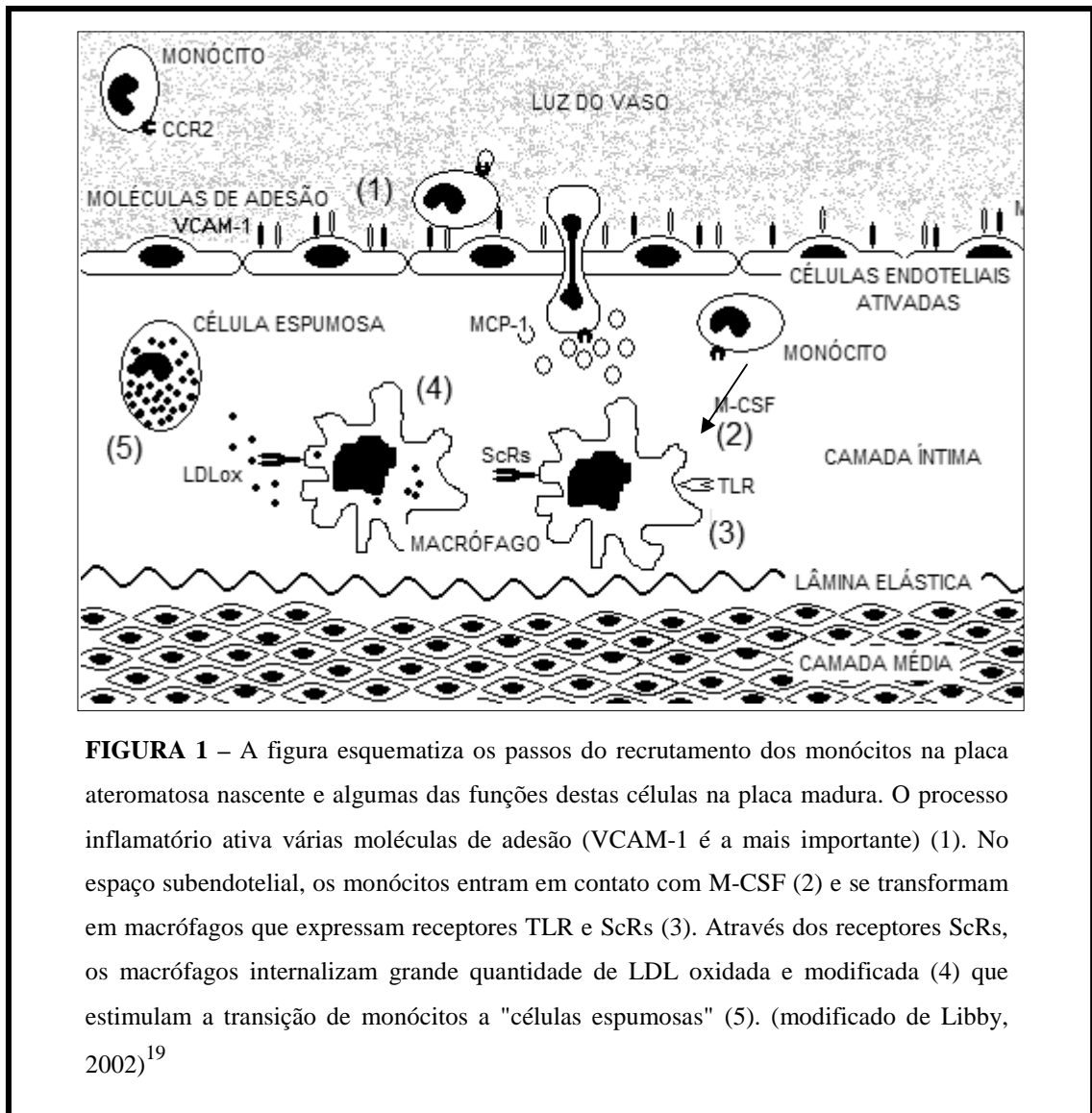
A LDL retida na matriz extracelular sofre modificações causadas por ação enzimática ou por oxidação não-enzimática. Destas modificações, originam-se os lisofosfolípidos que entre outros fatores como “espécies reativas de oxigênio” (EROS), hipertensão arterial sistêmica, diabetes mellitus, alterações genéticas, concentrações elevadas de homocisteína e

infecções por microorganismos como herpes vírus e a bactéria *Chlamydia pneumoniae*<sup>23,24</sup> promovem a disfunção das células endoteliais.<sup>14</sup> Esta ativação endotelial ocorre preferencialmente em locais como bifurcações, curvaturas e tortuosidades arteriais, onde a alta pressão de cisalhamento (*shear stress*) transforma o fluxo laminar em fluxo turbulento.<sup>11</sup>

A disfunção endotelial caracteriza-se, entre outras conseqüências, pelo comprometimento da produção endotelial de óxido nítrico, liberação de citocinas como a proteína quimiotática para macrófagos (MCP-1), aumento da expressão de moléculas de adesão intercelular 1 (ICAM-1) e moléculas de adesão da célula vascular 1 (VCAM-1) na superfície das células endoteliais.<sup>11</sup> Lisofosfolípidos presentes na LDL oxidada (LDLox), como a lisofosfatidilcolina, induzem a disfunção endotelial via ativação dos receptores “lectina like” para LDLox (LOX-1) presentes na célula endotelial.<sup>25,26</sup> De fato, a ativação dos receptores LOX-1 está associada à ativação do fator nuclear *kappa*-B (FNkB).<sup>27</sup> Quando ativado, o FNkB migra para o núcleo da célula, onde atua aumentando a expressão de genes que codificam mediadores inflamatórios, como citocinas pró-inflamatórias, fator de crescimento de colônia de monócitos/macrófagos (M-CSF), ICAM-1, VCAM-1 e MCP-1.<sup>28</sup>

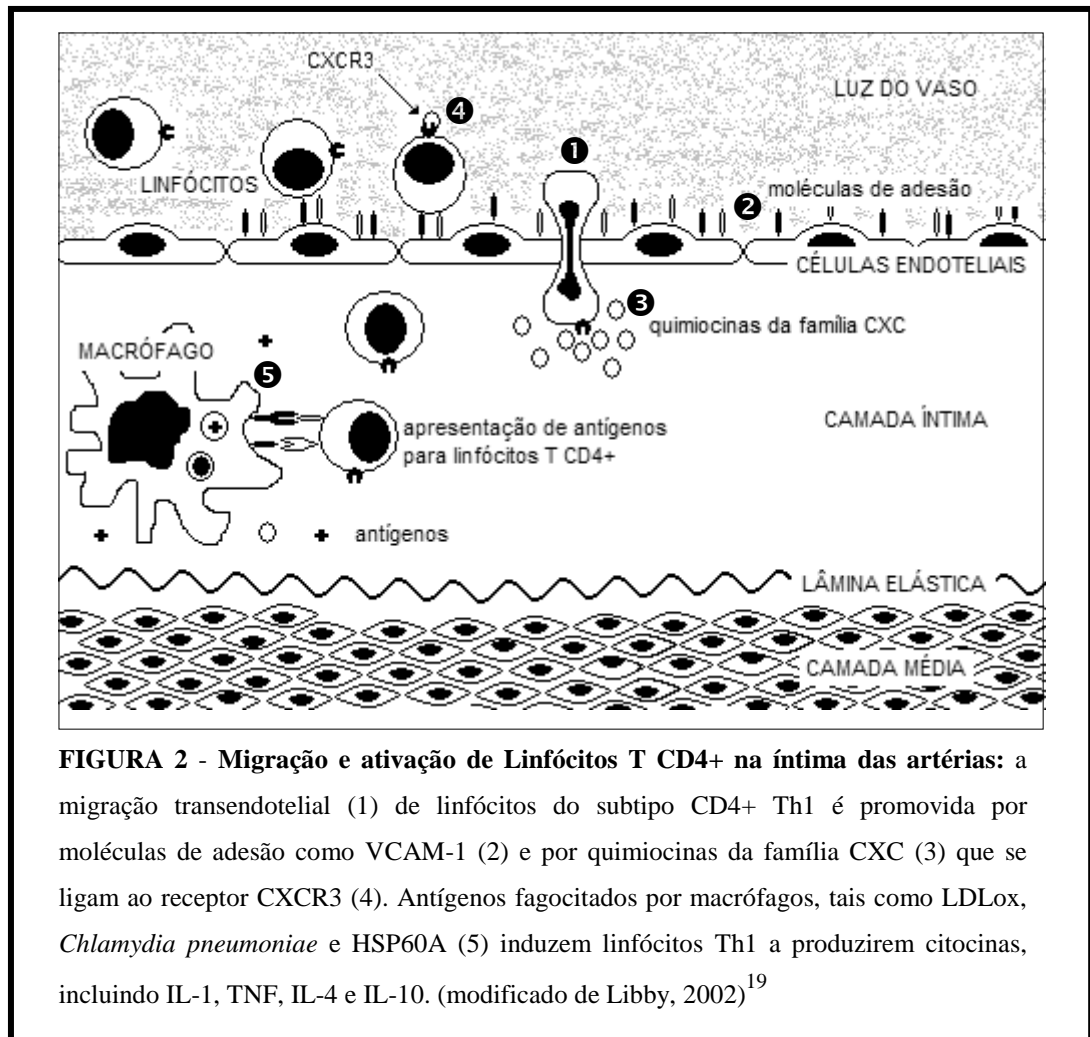
De maneira geral, o recrutamento de células do sistema imunológico do sangue periférico para a placa de ateroma em formação depende da ação de moléculas específicas, denominadas quimiocinas (como a MCP-1), além das moléculas de adesão (VCAM-1 e ICAM-1).<sup>11,29</sup> Embora a ação quimiotática da MCP-1 predomine sobre monócitos, seu receptor CCR2 também é encontrado em basófilos e linfócitos T. A quantificação de CCR2 correlaciona-se diretamente com a concentração sérica de LDL, indicando sua atuação no desenvolvimento da aterosclerose.<sup>30</sup>

Ao migrarem para o local do ateroma em formação, os monócitos entram em contato com o M-CSF produzido por células endoteliais e células musculares lisas e adquirem características morfológicas de macrófagos. Estes expressam receptores “scavenger” (ScRs) e receptores “Toll like” (TLR) de reconhecimento de padrão da “imunidade inata”.<sup>14</sup> A expressão de TLR nas placas de ateroma é significativa e dados de estudos com modelos animais indicam que, pelo menos em parte, a inflamação presente na placa deve ser atribuída a ativação destes receptores.<sup>14,19,16,11,31</sup>



**FIGURA 1** – A figura esquematiza os passos do recrutamento dos monócitos na placa aterosclerótica nascente e algumas das funções destas células na placa madura. O processo inflamatório ativa várias moléculas de adesão (VCAM-1 é a mais importante) (1). No espaço subendotelial, os monócitos entram em contato com M-CSF (2) e se transformam em macrófagos que expressam receptores TLR e ScRs (3). Através dos receptores ScRs, os macrófagos internalizam grande quantidade de LDL oxidada e modificada (4) que estimulam a transição de monócitos a "células espumosas" (5). (modificado de Libby, 2002)<sup>19</sup>

Os macrófagos exercem função primordial na formação da placa de ateroma internalizando a LDLox via ScRs<sup>14,32,11</sup> e assim transformando-se nas "células espumosas". As "células espumosas", via ativação dos receptores TLR, liberam grande quantidade de mediadores pró-inflamatórios, tais como interleucinas (IL) IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ , apresentam antígenos para a ativação de linfócitos T via Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) de classe II e liberam enzimas, como a metaloproteinase da matriz extracelular nove (MMP9), que degradam a capa fibrosa da placa de ateroma.<sup>32,31</sup>



Os linfócitos migram para a placa aterosclerótica em formação por um mecanismo semelhante ao recrutamento dos monócitos, porém a ativação ocorre de maneira diferente, via exposição de antígenos pelo MHC classe II e ativação concomitante de moléculas coestimulatórias B7.1 e B7.2 (CD80 e CD86 respectivamente).<sup>14</sup> A maioria dos linfócitos T presentes na placa de ateroma encontram-se em estágio crônico de ativação.<sup>14,10</sup> Estudos in vitro mostram que além da LDLox, outros antígenos, como a bactéria *Chlamydia pneumoniae* e a proteína de choque térmico 65/60 (HSP65/60), podem contribuir para a perpetuação da atividade de células T CD4+ derivados de placas de ateroma de humanos.<sup>14,10</sup>

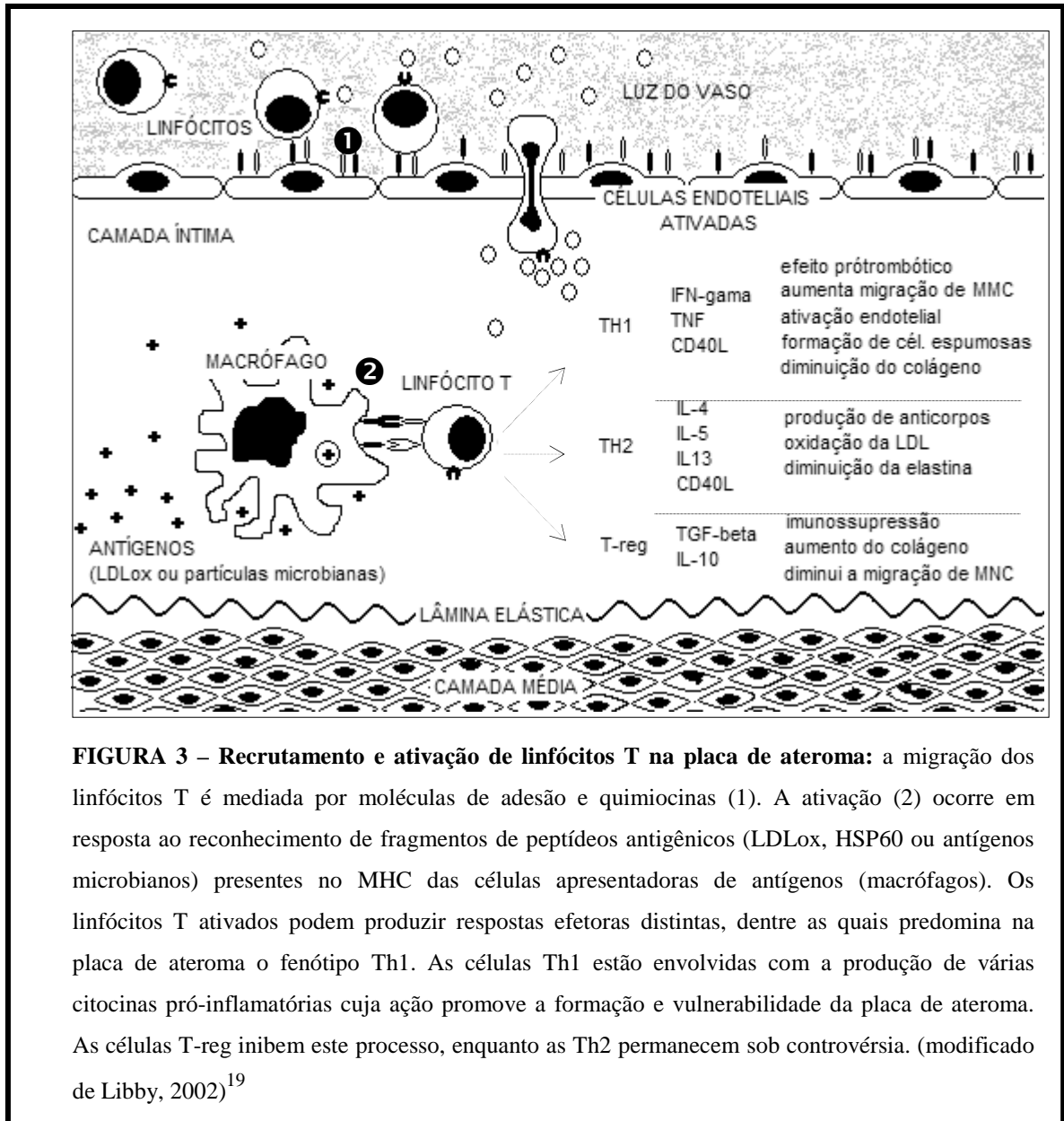
O papel dos linfócitos no desenvolvimento da lesão aterosclerótica foi demonstrado em estudos com camundongos deficientes em linfócitos T. Esses animais desenvolvem lesões ateroscleróticas menores em relação aos camundongos normais, mas desenvolvem a placa quando recebem linfócitos T CD4+ via “transferência adotiva”.<sup>18,33</sup> Linfócitos T CD4+ diferenciam-se em vários subtipos tais como as células efetoras T “auxiliar” 1 (Th1), T

“auxiliar” 2 (Th2) e diversos tipos de células T regulatórias (T-reg). Os linfócitos Th1 induzem a ativação de macrófagos e a reação de hipersensibilidade celular, enquanto os linfócitos Th2 promovem a inflamação eosinofílica e as reações de hipersensibilidade humoral. As T-reg suprimem funções efetoras de outras células do sistema imune.<sup>33,34</sup>

Citocinas são proteínas (geralmente glicoproteínas de cadeia única) de peso molecular relativamente baixo (raramente maior que 8-25 kDa) que regulam crescimento e ativação celular, inflamação, imunidade, reparo tecidual, fibrose e morfogênese. Algumas citocinas agem como quimiocinas promovendo o recrutamento de tipos celulares específicos. Atualmente, o termo citocina inclui os interferons (IFN), os fatores estimuladores de crescimento de colônia (CSF), os fatores de necrose tumoral (TNF) e as interleucinas (IL). Os IFN, originalmente reconhecidos em ensaios anti-virais, são potentes imuno-reguladores e fatores de crescimento subdivididos em três grupos: IFN- $\alpha$ , produzido principalmente por leucócitos em resposta a vírus e ácidos nucleicos; IFN- $\beta$  produzido principalmente por fibroblastos em resposta a vírus e ácidos nucleicos; e IFN- $\gamma$ , produzido principalmente por linfócitos em resposta a estímulos imunológicos. O termo interleucina, por sua vez, foi utilizado pela primeira vez em 1981 em referência a moléculas produzidas por leucócitos que agem sobre leucócitos. Posteriormente, demonstrou-se que algumas destas moléculas eram produzidas também por células não leucocitárias. Demonstrou-se também que embora os linfócitos B e T sejam os principais alvos das interleucinas, elas agem também sobre outras células, tais como fibroblastos e endotélio.<sup>35</sup>

A presença de IL-12 e IL-18 na placa de ateroma promove a diferenciação das células T no fenótipo Th1 e Th2 respectivamente. Na placa de ateroma predomina a ação de IL-12 sobre a IL-1 e portanto a maior atuação do fenótipo Th1, produtor de IFN- $\gamma$ , sobre Th2 (fig. 4).<sup>18</sup> De fato, o IFN- $\gamma$  é a principal citocina pró-inflamatória envolvida na aterogênese. Promove ativação de macrófagos e células endoteliais, com produção de moléculas de adesão, citocinas, quimiocinas, EROS, proteases e fatores de coagulação. Também inibe o efluxo de colesterol do espaço subendotelial.<sup>14,10</sup> Em modelos experimentais, a deleção do IFN- $\gamma$  ou de seu receptor reduz a gravidade da aterosclerose, enquanto que a administração de IFN- $\gamma$  recombinante acelera o desenvolvimento da lesão em vigência do estado de hipercolesterolemia.<sup>18</sup> Da mesma forma, a deleção de células Th1 reduz de maneira significativa o processo de aterosclerose em ratos com hipercolesterolemia.<sup>18</sup> Embora os linfócitos Th1 sejam os principais produtores locais do IFN- $\gamma$ , células *natural killer* (NK), linfócitos T CD8+ e fibras musculares lisas estimuladas por IL-18 também podem produzi-lo

em menor proporção.<sup>34</sup> Estas outras células também foram identificadas na placa de ateroma.<sup>10</sup>



As células NK não são antígeno-específicas e pertencem à imunidade inata. Atuam combatendo células que deixam de apresentar MHC e assim contribuem para a defesa contra células neoplásicas.<sup>34</sup> Alguns estudos indicam a participação das células NK na aterosclerose, porém os dados são controversos.<sup>14</sup>

Mastócitos, assim como os basófilos e eosinófilos, são células efetoras das reações de hipersensibilidade I. A ativação de mastócitos depende da ligação de complexos antígeno-IgE

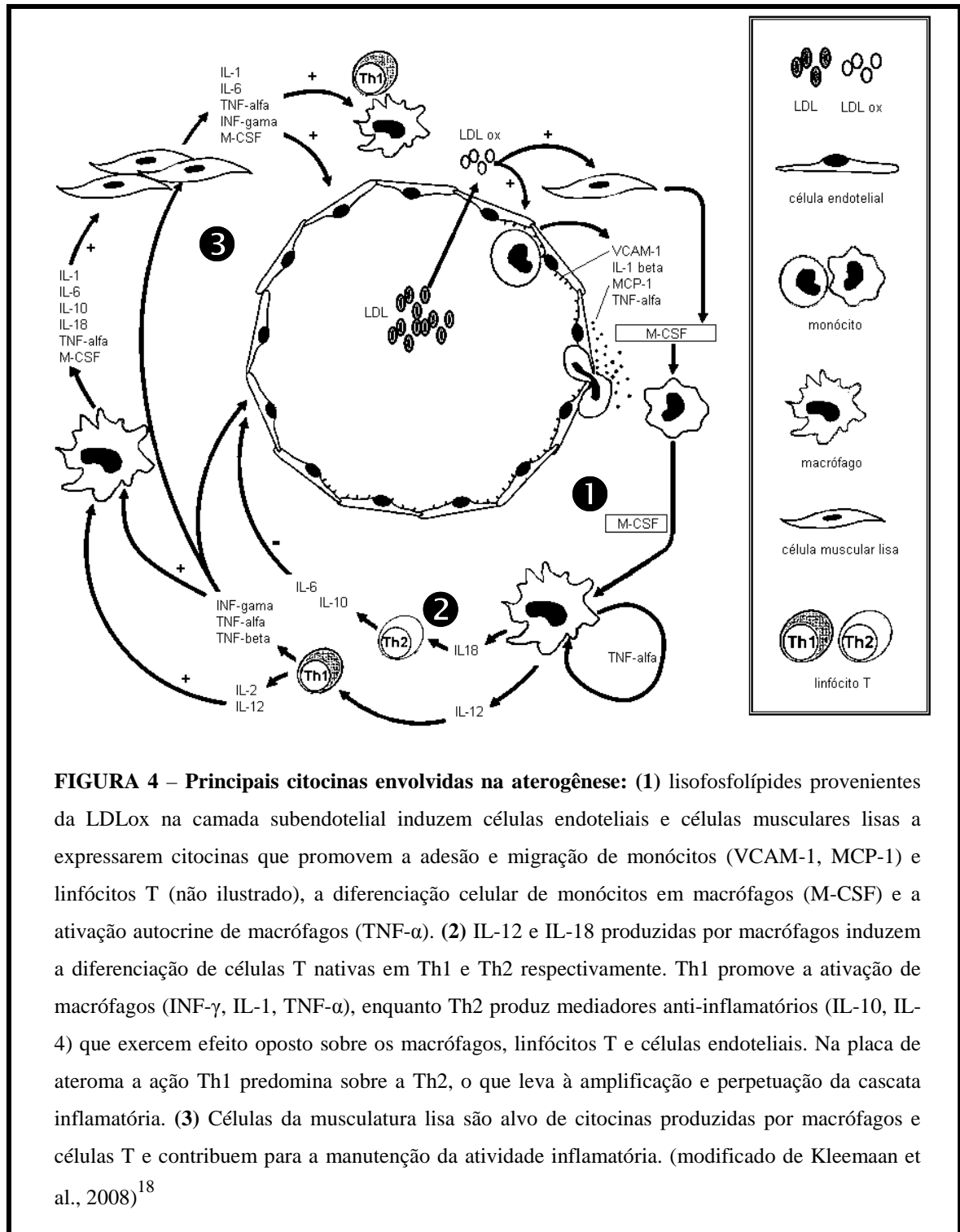


aos receptores específicos expressos em sua superfície celular.<sup>36</sup> Mastócitos ativados secretam grande quantidade de enzimas proteolíticas e são encontrados em locais de ruptura da placa.<sup>19</sup> Entretanto, a real contribuição da ação dos mastócitos para a instabilidade e ruptura da placa ainda deve ser melhor avaliada com novos estudos.

Embora várias evidências demonstrem o papel da atividade pró-inflamatória no desenvolvimento da aterosclerose, dados sobre a participação de células com atividade anti-inflamatória são escassos. Vários estudos mostram que a imunidade humoral protege contra a aterosclerose.<sup>14,32,11</sup> Estudos *in vitro* indicam que, pelo menos em parte, este efeito protetor se deve a produção de anticorpos neutralizantes contra os antígenos aterogênicos, inclusive a LDLox.<sup>14</sup> De fato, indivíduos submetidos à esplenectomia desenvolvem lesões ateroscleróticas mais rapidamente.<sup>37</sup> Porém, é muito pequena a quantidade de linfócitos B detectada nas placas de ateroma em fase de desenvolvimento inicial e intermediária. Em indivíduos com lesões avançadas, por outro lado, o número de células B e plasmócitos aumenta de maneira significativa nos infiltrados linfóides ao redor da camada adventícia.<sup>14</sup>

Algumas citocinas com ação anti-inflamatória, tais como IL-10 e o fator  $\beta$  transformador de crescimento de colônias (TGF- $\beta$ ), podem interferir no desenvolvimento da aterosclerose. A IL 10, por exemplo, liberada principalmente por linfócitos Th2 CD4+ e macrófagos, exerce importante ação inibitória sobre macrófagos e linfócitos T, inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias como IFN- $\gamma$ , IL1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  pelos monócitos, suprime a expressão de moléculas de adesão e coestimulação e inibe a apoptose.<sup>14</sup> De fato, ratos deficientes em IL-10 desenvolvem lesões ateroscleróticas maiores.<sup>14,18,10</sup> Humanos portadores de aterosclerose significativa apresentam concentrações plasmáticas menores em relação a controles sadios.<sup>38</sup> Além dos linfócitos Th2 CD4+ e macrófagos, células NK, células dendríticas e células T-reg também podem produzir IL-10.<sup>39</sup>

O TGF- $\beta$  é uma citocina pluripotente, produzida por uma variedade de células, tais como T-reg, macrófagos, células dendríticas, plaquetas, células endoteliais e células da musculatura lisa.<sup>40,35</sup> Apresenta capacidade de diminuir a expressão de moléculas de adesão e pode inibir a adesão de monócitos à parede dos vasos. Na aterosclerose, a síntese de TGF- $\beta$  está diminuída, possivelmente por ação da LDLox.<sup>40</sup>



## 2. Resposta inflamatória do cérebro à agressão

Lesões cerebrais de natureza variada, tais como impacto direto em trauma fechado, privação de nutrientes, neurotoxicidade, infecções virais e doenças auto-imunes estão associadas à perda neuronal secundária mediada pela atividade inflamatória local.<sup>41</sup> O mecanismo de lesão não está plenamente definido. A agressão cerebral de qualquer natureza

produz perda neuronal, edema, recrutamento de células polimorfonucleares e a bem definida “reação de gliose”, caracterizada por ativação, invasão, proliferação e hipertrofia de células derivadas do sistema fagocítico mononuclear (macrófagos e microglia). Originalmente a “reação de gliose” foi associada à restauração do tecido cerebral, com restabelecimento do suprimento circulatório, da integridade da barreira hemato-encefálica e homeostase local. Entretanto, comprovou-se que embora astrócitos ativados secretem fatores de crescimento que estimulam o prolongamento de axônios, o acúmulo destas células no local da lesão pode também diminuir a regeneração axonal e causar lesão neuronal secundária.<sup>42</sup> Estudos *in vitro* mostram que a reação de gliose pode ser induzida por TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$ .

### 3. Resposta inflamatória à agressão isquêmica

A perpetuação da atividade inflamatória leva a progressão da aterosclerose que resulta em isquemia. A isquemia focal, independente da causa, também age como um potente estímulo para deflagrar no cérebro a cascata inflamatória.<sup>43</sup> O tecido cerebral necrótico libera substâncias oxidantes que estimulam as células da glia (microglia e astroglia) a secretar citocinas e quimiocinas. Estes mediadores inflamatórios promovem respectivamente a expressão local de moléculas de adesão nos vasos cerebrais e um intenso recrutamento de leucócitos do sangue periférico para o parênquima cerebral. No parênquima cerebral, estes leucócitos ativados produzem citocinas, metaloproteinase da matriz extracelular, óxido nítrico e substâncias oxidantes que amplificam a resposta inflamatória local, causando lesão cerebral secundária.<sup>44</sup>

Estudos experimentais mostram que leucócitos circulantes aderem à parede dos vasos 4-6 horas após a instalação da isquemia. Os neutrófilos são as primeiras células inflamatórias a migrarem para os vasos da região isquêmica do cérebro e invadem a zona de infarto, onde liberam mediadores deletérios direta ou indiretamente para neurônios potencialmente viáveis da área de penumbra isquêmica. O pico deste processo ocorre próximo a 24 horas após o infarto e a partir deste período os granulócitos diminuem rapidamente até desaparecerem completamente na segunda semana.<sup>45,43,44</sup> Estudos histopatológicos mostram que os vasos do córtex isquêmico encontram-se preenchidos por leucócitos e muitos deles apresentam intenso edema a sua volta. A maioria destes leucócitos, predominantemente neutrófilos, encontram-se aderidos às paredes das vênulas pós-capilares e arteríolas da microcirculação, dificultando o fluxo sangüíneo local para a área de penumbra isquêmica.<sup>46,47,42,48</sup>

Um significativo número de linfócitos T infiltra preferencialmente a periferia da área isquêmica ainda na primeira semana do evento. Estudos com modelos experimentais de

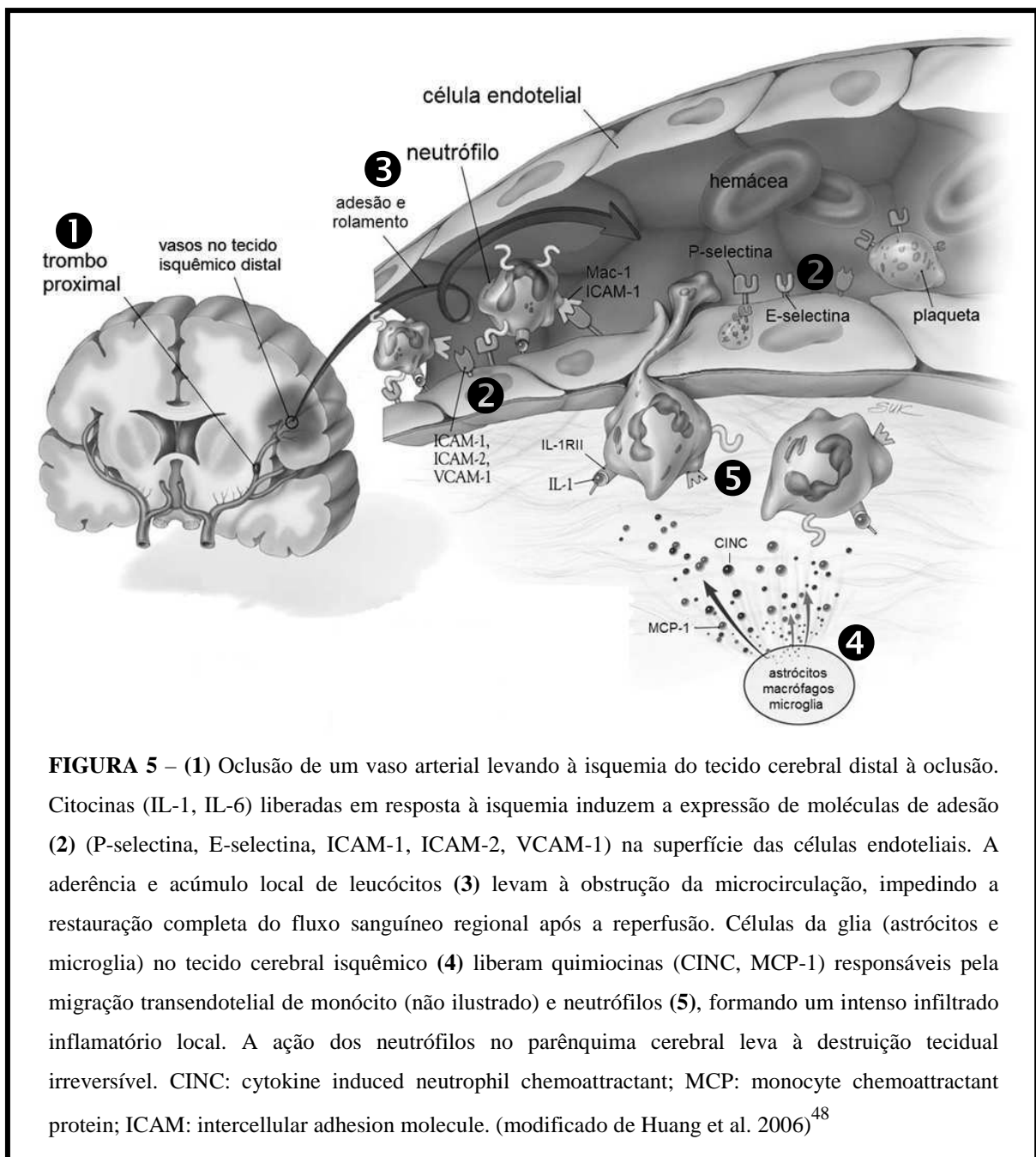
isquemia cerebral mostraram que, diferente de outros processos imunológicos que acometem o sistema nervoso, esta resposta das células T não parece ser desencadeada por uma estimulação sistêmica antígeno-dependente. O verdadeiro mecanismo de ativação destas células no cérebro isquêmico não está plenamente conhecido.<sup>44,43</sup>

Macrófagos provenientes do sangue periférico são atraídos preferencialmente à periferia da área de necrose, delimitando uma zona de fronteira entre necrose e tecido cerebral normal. Estes macrófagos agem diretamente removendo por fagocitose o tecido desvitalizado, ação fundamental para o processo de remodelamento tecidual.<sup>43</sup> Estudos com animais mostraram que o recrutamento dos macrófagos a partir do sangue periférico ocorre em uma fase mais tardia, dias após a instalação do ataque isquêmico e não tem relação temporal com a quebra da barreira hemato-encefálica.<sup>49</sup> Em humanos, foi demonstrado que a migração de macrófagos de fato é tardia e ocorre após o processo de morte neuronal ter cessado, indicando que a atuação deles é provavelmente mais benéfica do que deletéria para o cérebro isquêmico.<sup>50</sup>

As células da microglia são macrófagos residentes no parênquima cerebral e assim expressam receptores ScRs que lhes confere a capacidade de fagocitose. Histologicamente, a microglia ativada é indistinguível de macrófagos provenientes do sangue periférico. Entretanto, diferente destes, a microglia ativada tem atuação mais precoce e deletéria, contribuindo para o aumento da área de infarto cerebral.<sup>44,47</sup> O modo como ocorre a ativação da microglia não está completamente esclarecida. Estudos com ratos mostram que em cérebros isquêmicos esta ativação depende de receptores CD14, seguida pela estimulação de receptores TLR tipo 4. Em ratos, dois fenótipos distintos emergem. O primeiro é constituído por células CD4+ também encontradas em outras lesões do sistema nervoso central, de natureza não isquêmica. Esta população CD4+ aumenta gradualmente a partir do segundo dia e atinge pico no décimo quarto dia, quando cobrem inteiramente a área do infarto.<sup>43,44</sup> A segunda população de microglia expressa um fenótipo não usual, com moléculas de superfície de células T CD8+ e NK. Diferente da microglia CD4+, estas células CD8+ jamais foram encontradas em lesões cerebrais de natureza não isquêmica, tais como processos degenerativos do sistema nervoso central. São portanto restritas às áreas de necrose isquêmica, onde podem ser detectadas a partir do terceiro dia após o evento isquêmico. A presença destas células é transitória, pois até o décimo quarto dia desaparecem completamente. O papel da microglia CD8+ não está bem definido. Provavelmente além de

contribuir para a exacerbação da lesão isquêmica, esta população de células também auxilia o processo de remodelamento tecidual.<sup>43-45</sup>

A ativação de astrócitos desencadeada pela isquemia aumenta a expressão da proteína ácido fibrilar glial (GFAP) e desencadeia a “gliose reativa”, caracterizada por alterações estruturais e funcionais específicas. Os astrócitos também expressam o MHC e moléculas co-estimulatórias, estimulando a ação anti-inflamatória benéfica de linfócitos Th2 na resposta imunológica. Por outro lado, os astrócitos são capazes de produzir citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias e assim apresentam potencial para agravar a lesão cerebral isquêmica.<sup>44</sup>



**FIGURA 5** – (1) Oclusão de um vaso arterial levando à isquemia do tecido cerebral distal à oclusão. Citocinas (IL-1, IL-6) liberadas em resposta à isquemia induzem a expressão de moléculas de adesão (2) (P-selectina, E-selectina, ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1) na superfície das células endoteliais. A aderência e acúmulo local de leucócitos (3) levam à obstrução da microcirculação, impedindo a restauração completa do fluxo sanguíneo regional após a reperfusão. Células da glia (astrócitos e microglia) no tecido cerebral isquêmico (4) liberam quimiocinas (CINC, MCP-1) responsáveis pela migração transendotelial de monócito (não ilustrado) e neutrófilos (5), formando um intenso infiltrado inflamatório local. A ação dos neutrófilos no parênquima cerebral leva à destruição tecidual irreversível. CINC: cytokine induced neutrophil chemoattractant; MCP: monocyte chemoattractant protein; ICAM: intercellular adhesion molecule. (modificado de Huang et al. 2006)<sup>48</sup>

Em modelos experimentais de AVC, a isquemia cerebral induz a produção de citocinas pró-inflamatórias, tanto por células do sistema imunológico como por células do parênquima cerebral (glia e neurônios). IL-1 $\beta$ , IL-10 e TNF são induzidos precocemente à infiltração dos leucócitos, ainda durante as primeiras 24 horas da isquemia cerebral focal. Em contraste, a expressão de TGF- $\beta$  e IL-18 é tardia.<sup>43</sup>

As citocinas mais estudadas no AVC isquêmico são IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 e TGF- $\beta$ . A IL-2 atua nas fases iniciais da formação da placa de ateroma de acordo com alguns estudos. Foi descrita inicialmente como “fator de crescimento de células T” porque a proliferação de linfócitos T depende da presença de IL-2. Sua ação é bem específica, pois, além das células T, limita-se a influenciar a ativação de linfócitos B, células NK, macrófagos e oligodendrócitos. As células T embora consideradas os principais alvos da ação da IL-2, são também as principais produtoras desta IL. A IL-2 atua também estimulando a síntese de TNF e IL-1, além de ativar o sistema complemento. Por sua vez, a síntese de IL-2 é inibida pela IL-10.<sup>35</sup> São escassos os estudos que avaliam a participação da IL-2 na aterosclerose e no AVC isquêmico.

A IL-2 e seus receptores (IL-2R) estão presentes no cérebro normal, predominantemente no hipocampo e demais regiões límbicas relacionadas. O IL-2R é composto por um complexo de subunidades das quais três delas ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ) se combinam para formar diferentes subtipos funcionais de IL-2R. Os subtipos IL-2R  $\beta$  e  $\gamma$  são essenciais para que ocorra a transdução do sinal intracelular induzido por IL-2.<sup>35</sup> Em modelos animais, as concentrações de IL-2 e IL-2R diminuem após a isquemia.<sup>51</sup> Entretanto, o papel da IL-2 no desenvolvimento da lesão isquêmica não está claro.

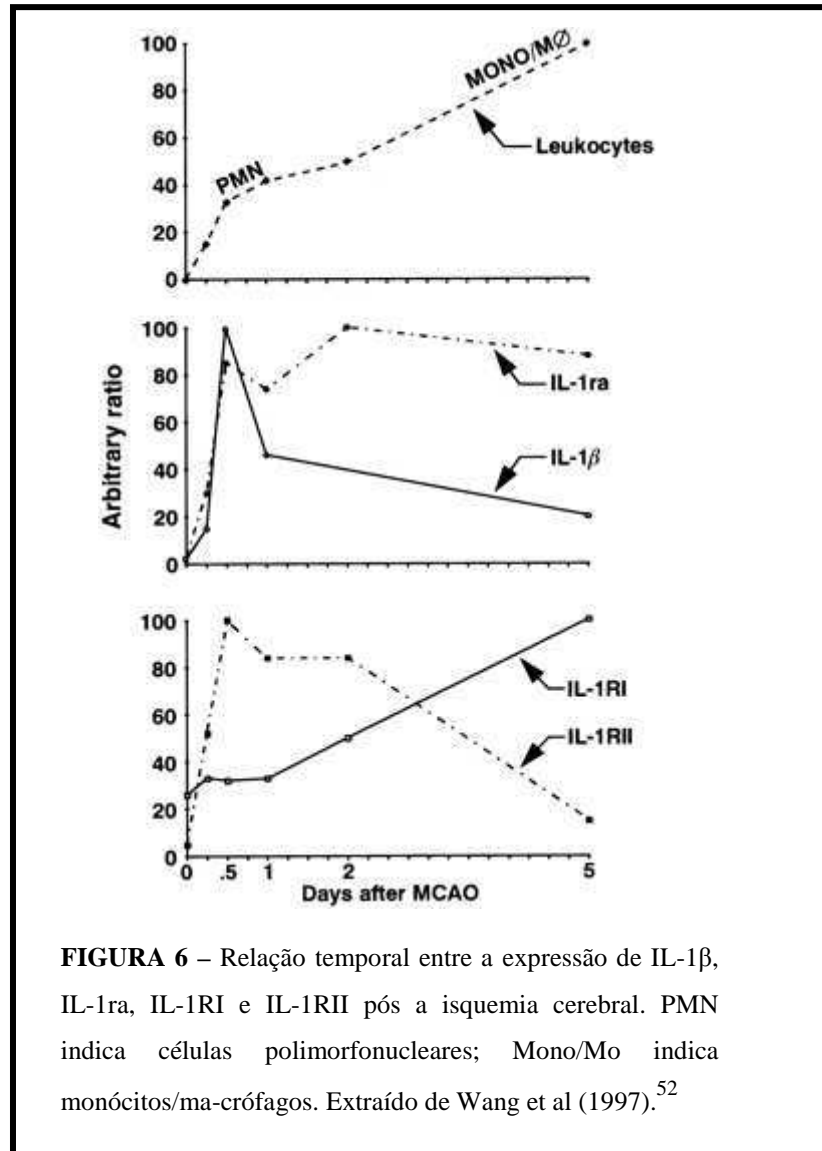
Tal como a IL-2, a IL-1 apresenta propriedades pró-inflamatórias. Existe em duas formas distintas,  $\alpha$  e  $\beta$ , as quais apresentam apenas um terço de homologia entre si.<sup>29</sup> Produzida por vários tipos de células como linfócitos B, células endoteliais e fibroblastos, a IL-1 foi originalmente descrita como “pirogênio endógeno” por sua ação no sistema nervoso central, onde induz a febre e a liberação de glicocorticóides. Age estimulando células T e B a produzirem substâncias importantes para a inflamação, como prostaglandinas e colagenases. Quase todas as células do organismo possuem receptores que respondem a IL-1. No fígado, por exemplo, a ativação destes receptores induz a produção de proteínas de fase aguda.<sup>35</sup>

A expressão de IL-1 é muito pequena no cérebro normal. O aumento da expressão do RNAm que codifica a IL-1 $\beta$  ocorre após agressões cerebrais de várias naturezas.<sup>41</sup> De acordo com estudos experimentais, nas lesões isquêmicas este aumento ocorre durante os primeiros

15-30 minutos após a oclusão da artéria cerebral média, atinge o nível máximo em 12-24 horas e retorna ao nível basal no quinto dia.<sup>43,42,52</sup> De acordo com Haqqani et al. (2005), ocorre também um segundo aumento do RNAm que codifica a IL-1 após 6-24, caracterizando uma expressão bifásica.<sup>53</sup> As principais células produtoras de IL-1 no sistema nervoso central são o endotélio, a microglia e os macrófagos infiltrados a partir do sangue periférico. A participação dos neurônios e astrócitos na liberação de IL-1 é controversa.<sup>43</sup>

A IL-1 atua através de sua ligação aos receptores IL-1RI e IL-1RII. O IL-1RI é uma glicoproteína de 80 KDa, encontrada predominantemente na superfície celular de linfócitos T, células endoteliais, fibras musculares lisas e fibroblastos. O IL-1RII é uma proteína de 68 KDa, presente em linfócitos B e macrófagos.<sup>43</sup> A principal diferença entre estes dois receptores é descrita no tamanho do domínio citoplasmático. A ativação do IL-1RI está associada à transdução do sinal intracelular responsável pelos efeitos pró-inflamatórios da IL-1. O IL-1RII, por outro lado, possui um domínio citoplasmático pequeno que parece estar associado à transdução de nenhum sinal intracelular, o que lhe confere a propriedade de antagonista natural da IL-1.<sup>43</sup> Estudos com modelo de isquemia cerebral focal em ratos mostraram que a expressão do RNAm que codifica o receptor IL-1RI aumenta no quinto dia de isquemia. Em contraste, a expressão do RNAm do IL-1RII aumenta de maneira mais rápida, intensa e duradoura.<sup>52</sup>

A IL-1ra é uma glicoproteína de 23-25 KDa, naturalmente liberada por monócitos/macrófagos, células endoteliais, fibroblastos, neurônios e células da glia que compete com a IL-1 pela ligação no receptor IL-1RI sem, no entanto, ativá-lo. A IL-1ra tem afinidade pelo IL-1RI superior a IL-1- $\alpha$  e  $\beta$ .<sup>42</sup> Estudos com animais mostraram que a expressão do RNAm da IL-1ra aumenta após cerca de seis horas de oclusão da artéria cerebral média em ratos, ou seja, sua liberação é praticamente concomitante à da IL-1. Em contrapartida, o RNAm da IL-1ra permanece elevado além do período de elevação da IL-1.<sup>52</sup> Estes dados sugerem que talvez a liberação da IL-1ra faça parte de um sistema regulatório da atividade inflamatória local e que as mesmas fontes celulares podem ser responsáveis pela liberação tanto de IL-1 quanto de IL-1ra após isquemia cerebral focal. Os mediadores responsáveis pela indução da IL-1ra no AVC isquêmico não são conhecidos. Entretanto, estudos prévios identificaram algumas citocinas, tais como IL-1, TNF, IL-6, TGF- $\beta$  e IL-10 como possíveis indutores da IL-1ra.<sup>43,42,52</sup>



Vários estudos utilizando modelos experimentais de isquemia cerebral focal têm associado a IL-1 a efeitos neurotóxicos sobre a zona de penumbra isquêmica e lesão cerebral secundária. De fato, a deleção do receptor IL-1RI em camundongos está associada a redução da extensão do infarto.<sup>54,52</sup> Por outro lado, a administração de IL-1 intraventricular exacerba a lesão isquêmica tanto em camundongos selvagens quanto em camundongos nulos em IL-1RI, indicando que a ação deletéria da IL-1 independente deste receptor.<sup>55</sup> Estudos utilizando camundongos deficientes em IL-1 mostraram que nestes animais a área de infarto cerebral é significativamente menor em relação ao controle.<sup>43</sup> O pré-tratamento com IL-1ra exógeno reduziu o tamanho da área isquêmica, indicando que, embora haja co-indução de IL-1 e IL-1ra na isquemia focal, a ação agonista da IL-1 normalmente predomina sobre o antagonista.<sup>43</sup> Entretanto, para garantir o benefício da neuroproteção, a IL-1ra deve ser administrada



previamente ou imediatamente após a indução da isquemia cerebral. Ainda assim, estima-se que a concentração de IL-1ra necessária para neutralizar o efeito agonista seja cerca de 100 vezes a concentração da IL-1.<sup>17</sup> Posteriormente mostrou-se também que a inibição da enzima caspase-1, responsável pela clivagem da molécula biologicamente inativa pro-IL-1 em IL-1 ativa, reduz o tamanho do infarto em ratos e camundongos.<sup>41</sup>

As diferenças na expressão dos receptores IL-1RI e IL-1RII após isquemia cerebral focal são possivelmente reflexos de suas distintas finalidades. IL-1RI tem maior afinidade a ligação com a IL-1ra do que o IL-1RII. Este, por sua vez, liga-se preferencialmente a IL-1 $\beta$ . Tais ligações produzem efeitos similares, contendo a atividade da IL-1.<sup>42</sup>

O mecanismo pelo qual a IL-1 exacerba a isquemia cerebral focal não está definido. Sabe-se que a IL-1 por si só não é neurotóxica *in vivo*. Entretanto, a IL-1 pode induzir a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais e a liberação de quimiocinas por células da glia, estimulando a infiltração local de células polimorfonucleares envolvidas na apoptose de neurônios<sup>56</sup> (fig. 5).

A IL-10 é uma citocina com atividade anti-inflamatória produzida no sistema nervoso central<sup>57</sup>, onde pode atuar bloqueando vias de sinalização da apoptose, reduzindo os efeitos de citocinas inflamatórias como IL-6 e TNF- $\alpha$ , induzindo anergia nos linfócitos T que infiltram o cérebro, modulando a vulnerabilidade neuronal a ação de amino-ácidos excito-tóxicos e inibindo a óxido-nítrico sintase (NOS).<sup>39</sup> A concentração de IL-10 aumenta durante o curso de várias doenças como esclerose múltipla, demência de Alzheimer, meningites e inclusive isquemia.<sup>39</sup> O aumento da concentração de IL-10 foi observado precocemente nas primeiras horas do AVC, atingindo níveis máximos entre o terceiro e sétimo dia.<sup>58</sup> Animais nudos (*knockout*) para o gene que codifica a IL-10 apresentam maior infiltração de neutrófilos na área de infarto cerebral, aumento de TNF- $\alpha$ , ICAM-1, MMP-2 e MMP-9.<sup>59</sup> A presença de amino-ácidos excito-tóxicos, produtos do óxido nítrico (NO), IL-6, TNF- $\alpha$  e de MMP estão associados com piora do prognóstico do AVC<sup>44</sup>, o que pode explicar o potencial benefício da IL-10 para pacientes com AVC isquêmico.

## 2. OBJETIVOS

1. Analisar se existe associação entre os valores de IL-1 $\beta$ , IL-2 e IL-10 em sobrenadante de cultura de células mononucleares e a gravidade do déficit neurológico na chegada do paciente com AVC isquêmico ao pronto-socorro.
2. Analisar se existe associação entre os valores de IL-1 $\beta$ , IL-2 e IL-10 em sobrenadante de cultura de células mononucleares e a evolução do déficit neurológico durante as primeiras 72 horas do AVC isquêmico.
3. Analisar se existe associação entre os valores de IL-1 $\beta$ , IL-2 e IL-10 em sobrenadante de cultura de células mononucleares nas primeiras horas da fase aguda do AVC isquêmico e a evolução da incapacidade funcional após 18 meses de seguimento clínico.
4. Avaliar se existe associação entre IL-1 $\beta$ , IL-2 e IL-10 em sobrenadante de cultura de células mononucleares e a incidência de IAM, AVC ou óbito em até 18 meses.

### 3. CASUÍSTICAS E MÉTODOS

Estudo descritivo, prospectivo e comparativo, redigido mediante análise de dados.

#### 3.1. *Seleção dos pacientes*

Para compor o grupo 1 foram avaliados 87 pacientes consecutivos, internados no pronto-socorro do Hospital Central da Santa Casa de São Paulo durante as segundas, terças e quartas feiras, de junho de 2005 a dezembro de 2006, com até 72 horas de AVC isquêmico, diagnosticado segundo os critérios do TOAST<sup>7</sup> (vide apêndices) para aterosclerose de grandes artérias, cardioembolismo ou doença de pequenas artérias. Os critérios de inclusão e exclusão estão descritos no quadro 1.

Sessenta e um pacientes apresentaram um ou mais critérios que impediram a inclusão: 32 não assinaram o termo de consentimento, 52 não souberam definir a data e horário de instalação do AVC, três eram portadores de neoplasia e seis receberam diagnóstico de neoplasia durante os primeiros dias de internação após a instalação do AVC. Assim, apenas 26 dos 87 pacientes selecionados foram de fatos incluídos no estudo.

**Quadro 1** – critérios de inclusão e exclusão para o grupo 1

Inclusão

- homens e mulheres > 18 anos
- internados no pronto-socorro da Santa Casa de São Paulo durante o período de jun/05 a dez/06
- AVC isquêmico diagnosticado e classificado segundo os critérios do TOAST<sup>7</sup>
- quadro neurológico com máximo de 72h de instalação
- termo de consentimento livre e esclarecido assinado pelo paciente ou seu representante legal.

Exclusão

- doença inflamatória ou infecciosa crônica conhecida
- neoplasia, doença hematológica, insuficiência renal ou hepática
- evidência de hemorragia na TC de crânio
- data e horário da instalação do AVC não conhecidos

O grupo 2 foi constituído por indivíduos controles, ou seja, não portadores de doença cerebrovascular, não pareados com o grupo 1 e em proporção mínima de um controle para cada caso. Durante o mês de junho de 2005, foram selecionados pacientes consecutivos com

pelo menos dois fatores de risco para AVC isquêmico<sup>60</sup> (quadro 2), em acompanhamento regular no ambulatório de clínica do Hospital Geriátrico e de Convalescentes D. Pedro II. Portadores de neoplasia, doença inflamatória ou infecciosa, doença hematológica conhecida, insuficiência renal ou hepática grave foram excluídos (quadro 3).

**Quadro 2** – fatores de risco modificáveis bem documentados<sup>60</sup>

- Doença coronariana
- Insuficiência cardíaca
- Doença arterial periférica
- Hipertensão arterial sistêmica
- Tabagismo
- Diabetes
- Estenose de carótidas assintomática
- Fibrilação atrial
- Anemia falciforme
- Dislipidemia
- Obesidade
- Sedentarismo
- Terapia de reposição hormonal pós menopausa

**Quadro 3** – critérios de inclusão e exclusão para o grupo 2

Inclusão

- homens e mulheres > 18 anos
- pacientes em acompanhamento regular no ambulatório de clínica do Hospital Geriátrico e de Convalescentes D. Pedro II com pelo menos dois fatores de risco modificáveis em tratamento<sup>60</sup>
- termo de consentimento livre e esclarecido lido e assinado

Exclusão

- antecedente de doença cerebrovascular conhecido
- doença inflamatória ou infecciosa crônica conhecida
- neoplasia, doença hematológica, insuficiência renal ou hepática

Este estudo foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo (projeto número 64/05). Todos os pacientes incluídos ou seus representantes legais assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e receberam cópia deste documento (vide apêndices).

### 3.2. *Casuística*

O grupo 1 foi constituído por 26 pacientes, sendo 14 mulheres e 12 homens, com média de idade de 65,54 ( $\pm 12,54$ ) anos, dos quais 13 foram classificados como possível e cinco como provável AVC aterotrombótico, quatro como doença de pequenos vasos (lacunares) e quatro como AVC cardioembólico, de acordo com os critérios do Toast<sup>7</sup> (quadro 4). O grupo controle foi constituído por 30 pacientes, sendo 23 mulheres e sete homens com média de idade de 73,06 ( $\pm 10,63$ ) anos (quadro 5).

**QUADRO 4** – descrição dos pacientes com diagnóstico de AVC isquêmico agudo, incluídos no grupo 1.

No	Sexo	idade (anos)	Comorbidades	Toast
1	F	68	O, HAS	1A
2	M	77	C, AIT, H, HAS	1A
3	M	51	HAS, T, IAP	1B
4	F	31	FOP, TG, T, S	3
5	F	75	HAS, C, TG	1A
6	F	70	HAS, DM, AVC	1B
7	M	61	TG, O	1A
8	M	67	HAS, DM	1A
9	M	61	T, TG	2
10	M	64	HAS, DM, T	2
11	F	51	HAS, T, S	1B
12	M	80	HAS, O	2
13	F	75	HAS, S	2
14	M	64	Aa, HAS, T	3
15	F	84	HAS, Ac, ICC	3
16	M	59	HAS, T	1A
17	M	67	HAS, AVC	1B
18	M	63	DM, S	1A
19	M	59	T, HAS	1A
20	F	46	T, S	1A
21	F	74	S, HAS	1A
22	F	81	Ac, HAS, S	3
23	F	58	DM, HAS, C, S	1B
24	F	75	HAS, C, AVC	1A
25	F	86	DM, S, O, HAS	1A
26	F	57	HAS, DM, IAM	1A

M:F = 12:14  
Média de idade = 65,54 (±12,61) anos

F: feminino; M: masculino; Aa: arritmia cardíaca aguda; Ac: arritmia cardíaca crônica; FOP: forame oval patente; HAS: hipertensão arterial sistêmica; DM: diabetes mellitus; T: tabagismo; C: hipercolesterolemia; TG: hipertrigliceridemia; ICC: insuficiência cardíaca congestiva; O: obesidade; S: sedentarismo; AVC: acidente vascular cerebral prévio; AIT: ataque isquêmico transitório; IAM: infarto agudo do miocárdio prévio; H: hipertireoidismo controlado; IAP: insuficiência arterial periférica crônica; Toast = classificação do AVC isquêmico segundo Toast: 1A – possível AVC de grandes vasos (aterorombótico), 1B provável AVC de grandes vasos (aterotrombótico), 2 – doença de pequenos vasos (lacunar), 3 – cardioembólicos.

**QUADRO 5** – descrição dos pacientes incluídos no grupo 2 (controles)

No	sexo	Idade (anos)	fatores de risco
1	F	82	Ac, HAS, C
2	F	69	HAS, DM
3	F	74	Ac, T, C
4	F	64	C, HAS
5	F	87	HAS, DM, C
6	M	88	O, TG, C, HAS, DM
7	F	91	HAS, Ac, DM, ICC
8	M	89	ICC, HAS, DM
9	F	74	Ac, HAS, DM, ICC
10	F	77	DM, HAS
11	F	64	HAS, T
12	M	59	HAS, DM, O
13	M	43	T, HAS
14	F	67	T, C
15	F	86	ICC, HAS, S
16	F	84	HAS, DM
17	F	70	HAS, C
18	F	58	HAS, DM, C
19	F	64	HAS, C
20	M	74	S, T, C
21	F	66	HAS, TG, C
22	F	67	S, C
23	M	72	C, TG, DM
24	F	79	HAS, DM, O
25	F	72	HAS, DM, C, O.
26	F	68	HAS, S, TG
27	F	69	HAS, O, C, TG
28	M	77	HAS, C, TG
29	F	81	HAS, C
30	F	77	DM, HAS, C

M:F = 7:23  
Média de idade = 73,06 ( $\pm$ 10,63) anos

F: feminino; M: masculino; Aa: arritmia cardíaca aguda; Ac: arritmia cardíaca crônica; FOP: forame oval patente; HAS: hipertensão arterial sistêmica; DM: diabetes mellitus; T: tabagismo; C: hipercolesterolemia; TG: hipertrigliceridemia; ICC: insuficiência cardíaca congestiva; O: obesidade; S: sedentarismo; AVC: acidente vascular cerebral prévio; AIT: ataque isquêmico transitório; IAM: infarto agudo do miocárdio prévio; H: hipertireoidismo controlado; IAP: insuficiência arterial periférica crônica.

### 3.3. Avaliação clínica e laboratorial

As amostras de sangue venoso periférico para posterior quantificação da IL-1 $\beta$ , IL2 e IL-10 foram obtidas dos pacientes do grupo 1 no momento da inclusão, após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. O material foi coletado no Pronto-Socorro Central da Santa Casa de São Paulo e encaminhado em tubo contendo heparina sódica ao laboratório da Disciplina de Imunologia (Departamento de Ciências Patológicas) da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo (FCMSCSP), dentro de no máximo 30 minutos. O tempo médio entre a instalação do AVC e a coleta do sangue foi de 22,85 horas (7 – 49 horas).

Para mensurar a intensidade do déficit causado pelo AVC, todos os pacientes incluídos no grupo 1 foram avaliados segundo a *National Institute of Health Stroke Scale (NIHSS)*<sup>61,22,62-64</sup> no momento da chegada ao pronto-socorro e após 72 ( $\pm 3$ ) horas da instalação do AVC. Os pacientes foram classificados em três categorias, de acordo com a gravidade do déficit neurológico segundo o *score* da NIHSS da chegada ao pronto-socorro. Pacientes com *score* inferior ou igual a quatro foram classificados como AVC leve; *score* entre 5 e 18 (inclusive) foram considerados AVC moderado e *score* superior ou igual a 19 receberam a classificação de AVC grave.

A Escala de Rankin modificada (mRS)<sup>65</sup>, capaz de avaliar a incapacidade funcional acarretadas pela isquemia cerebral, foi aplicada após 72 ( $\pm 3$ ) horas, seis ( $\pm 1$ ) e finalmente 18 ( $\pm 3$ ) meses após o AVC. Seis ( $\pm 1$ ) meses após o AVC, foi solicitado por meio de contato telefônico, um parecer sobre o estado atual de saúde do paciente. Os pacientes ou seus familiares responderam a seguinte pergunta: “desde a data da alta, você considera que houve melhora ou piora em relação ao AVC?”.

Baseado primariamente na variação do *score* da mRS no sexto mês em relação ao obtido na 72 horas após o AVC, os pacientes foram classificados em “melhor” (diminuição do *score*) ou “pior” (aumento do *score*). Nos casos em que não houve variação do *score* da mRS, foram classificados como “melhor” os pacientes cujo parecer foi de estabilidade clínica ou de melhora. Inversamente, foram classificados como “pior” os casos de óbito ou de pacientes cujo parecer foi de piora.

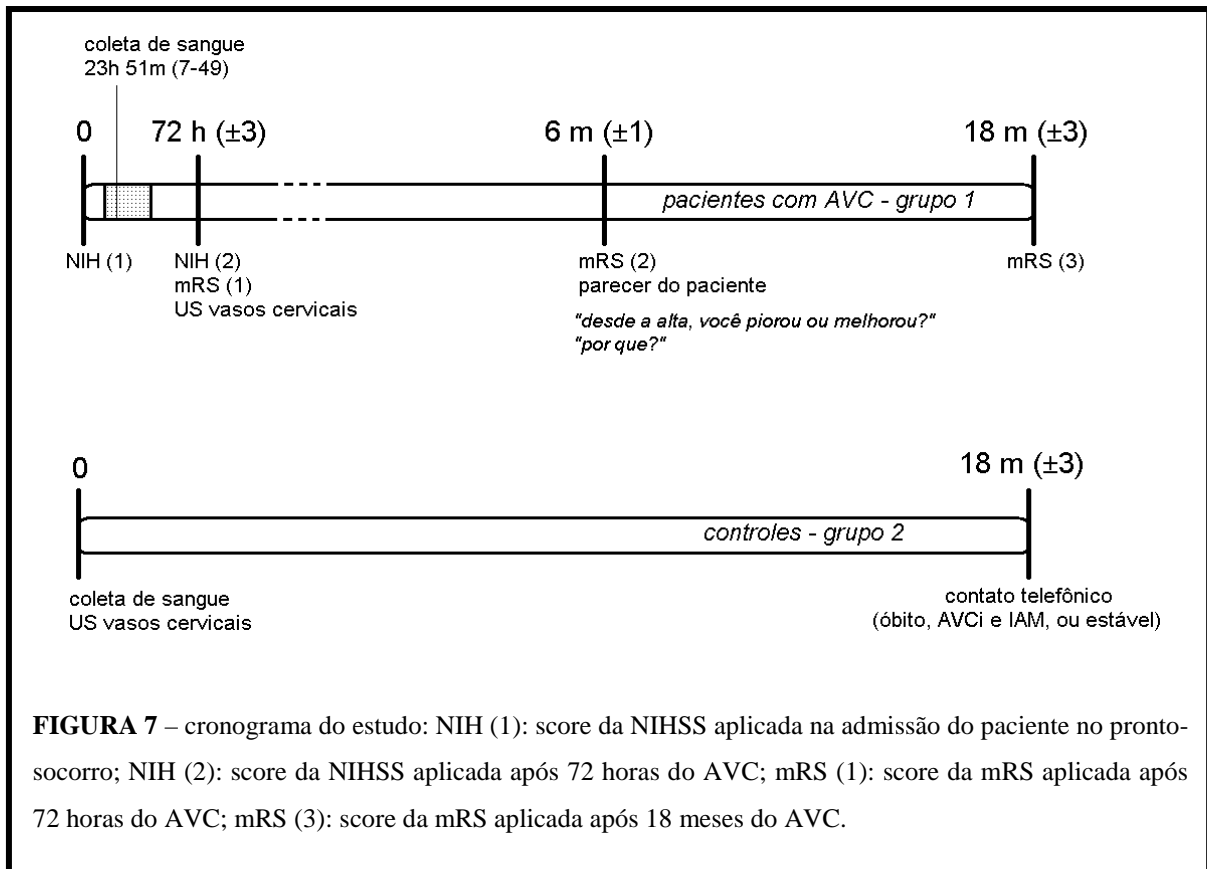
Os pacientes realizaram ultrassonografia com Doppler das artérias carótidas durante as primeiras 72 horas do AVC, exceto nos casos em que as condições clínicas gerais do paciente não permitiram o seu deslocamento até o serviço de radiologia. De acordo com o resultado do exame, foram classificados em duas categorias: 1) pacientes sem estenose,



incluindo aqueles com espessamento médio-intimal; 2) pacientes com estenose de qualquer grau, incluindo as lesões que exercem estenose inferior ou igual a 49% do diâmetro da artéria, lesões com 50 a 69% de estenose e estenose crítica, considerada maior ou igual a 70% da luz do vaso. Todos os pacientes receberam os cuidados clínicos e neurológicos necessários.

As amostras de sangue venoso periférico posterior quantificação da IL-1 $\beta$ , IL2 e IL-10 dos pacientes do grupo 2 também foram colhidas no momento da inclusão, após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Em seguida os pacientes foram encaminhados ao serviço de radiologia onde realizaram a ultrassonografia com Doppler das artérias carótidas. Durante o período de seguimento do estudo, mantiveram o acompanhamento médico regular no Hospital Geriátrico e de Convalescentes D. Pedro II recebendo todos os cuidados clínicos necessários. Ao final do período de seguimento de 18 meses do estudo, foi solicitado por meio de contato telefônico, um parecer sobre o estado atual de saúde do paciente. Os pacientes ou seus familiares responderam a seguinte pergunta: “como está passando?” As respostas aceitas foram: 1) óbito e sua provável causa; 2) AVC ou IAM; 1) “estável”, quando não foi relatado ocorrência de óbito, AVC ou IAM no período.

Em relação ao resultado da ultrassonografia de carótidas, os pacientes foram classificados, para fins estatísticos, tal como o grupo 1, ou seja, em dois subgrupos: 1) pacientes sem estenose ou com apenas espessamento médio-intimal; 2) pacientes com estenose inferior ou igual a 49%, 50 a 69% e superior ou igual a 70%.



**FIGURA 7** – cronograma do estudo: NIH (1): score da NIHSS aplicada na admissão do paciente no pronto-socorro; NIH (2): score da NIHSS aplicada após 72 horas do AVC; mRS (1): score da mRS aplicada após 72 horas do AVC; mRS (3): score da mRS aplicada após 18 meses do AVC.

### 3.4. Ensaios imunológicos

As células linfóides do sangue periférico foram obtidas a partir de 30 mL de sangue coletado em tubos contendo heparina sódica. A suspensão foi centrifugada em gradiente de Ficoll-Paque (Pharmacia<sup>®</sup>) (300g, 30 minutos, temperatura ambiente). O anel de leucócitos foi coletado, transferido para outro tubo e lavado duas vezes com meio RPMI-1640 (Cultilab<sup>®</sup>) gelado estéril (300g, 10 minutos, 4° C). O anel de células mononucleares foi ressuspensa em meio RPMI-1640 (Cultilab<sup>®</sup>) suplementado (com soro fetal bovino 10% + L-glutamina [2mM] + gentamicina [5µg/mL]) e a concentração ajustada para  $1 \times 10^6$  cel/mL estimulada com fitohemaglutinina por 48 horas. O sobrenadante das culturas de células foi aliquoteado e armazenado a -70°C para posterior análise.

As concentrações dos sobrenadantes das culturas de linfócitos de IL-1 $\beta$ , IL-2 e IL-10 foram determinadas por método ELISA, com kits disponíveis comercialmente para ensaio imunológico quantitativo (*OptEIA*<sup>™</sup>) obtido da empresa *BD Biosciences*. Os procedimentos do teste foram realizados de acordo com as instruções do fabricante (disponível no apêndice). O limite de detecção do ensaio é de 7,8 pg/mL e o máximo de 500 pg/mL. A leitura das

amostras foi realizada em 450 nm, em diluições 1:10, no leitor *ELx800 (Bio Tek Instruments Inc<sup>®</sup>)*. Valores superiores a 5000 pg/mL foram obtidos por aproximação (coeficiente de linearidade de 0,9979). Os ensaios foram realizados em duplicata, conforme as orientações do fabricante. As análises foram realizadas por técnicos cegos para os dados clínicos.

### 3.5. Análise Estatística

Os resultados foram analisados com o software SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*) v13.0, considerando nível de significância  $p < 5\%$ . O *Teste de Mann-Whitney* foi aplicado inicialmente para avaliar as diferenças entre os dois grupos em relação aos valores das interleucinas dosadas. A *Análise de Correlação de Spearman* foi utilizada para verificar a relação entre os valores das interleucinas e a gravidade do AVC, medida pela NIHSS na chegada ao hospital.

Posteriormente, o *Teste de Mann-Whitney* foi novamente aplicado no grupo 1 para comparar os valores das interleucinas com a evolução clínica do AVC nas primeiras 72 horas (NIHSS), em seis meses (mRS e parecer do paciente) e em 18 meses (mRS). A *Análise da Curva ROC (Receiver-Operating Characteristic)* foi aplicada sobre as variáveis com significância para identificar os valores de corte que subdividem o grupo 1 de acordo com a melhora ou piora clínica. A mesma análise foi realizada para o grupo 2 para correlacionar os valores das concentrações das interleucinas com o parecer do paciente em 18 meses e com a presença ou não de estenose carotídea. O *Teste Exato de Fisher* foi utilizado para comparar os dois grupos em relação à presença de estenose carotídea por placa de ateroma. Finalmente, os testes  $\chi^2$  e *t student* foram utilizados para avaliar respectivamente a variável qualitativa “sexo” e a idade nos dois grupos.

## 4. RESULTADOS

A média de idade dos pacientes do grupo 1 é 7,62 anos inferior à do grupo 2, o que representa uma diferença estatística significativa ( $p = 0,019$ ). Em relação à proporção de homens e mulheres, embora haja nítida predominância de mulheres no grupo 2, essa diferença não é significativa ( $\chi^2 = 3.236$ ,  $p = 0,1296$ ).

Dos 26 pacientes do grupo 1, 16 foram avaliados por ultrassonografia com Doppler de carótidas (quadro 6). Cinco pacientes faleceram antes de realizar o exame (casos 5, 7, 14, 15 e 22). Três não realizaram o exame por dificuldade no agendamento junto ao serviço de radiologia (casos 9, 10 e 20). Os casos 16 e 21 não realizaram o exame devido à falta de condições clínicas para se deslocarem até o serviço de radiologia.

**QUADRO 6** – descrição dos pacientes com diagnóstico de AVC isquêmico agudo, incluídos no grupo 1.

No	grau de estenose pelo US de carótidas
1	< 40%
2	< 40%
3	< 69% (calcificada)
4	Normal
5	Não avaliado
6	< 59% (calcificada)
7	Não avaliado
8	15-49%
9	Não avaliado
10	Não avaliado
11	> 80% (trombo vermelho)
12	< 40%
13	Normal
14	Não avaliado
15	Não avaliado
16	Não avaliado
17	50-69%
18	< 40%
19	< 40%
20	Não avaliado
21	Não avaliado
22	Não avaliado
23	50-69%
24	15-49%
25	15-49%
26	< 40%

US: ultrassonografia,;

Dentre os pacientes que realizaram o exame, apenas em dois não foi identificado anormalidade (casos 4 e 13). Dos demais pacientes, nove (casos 1, 2, 8, 12, 18, 19, 24, 25, 26) apresentaram placas de ateroma nas carótidas estenose significativa, ou seja, inferior a 50% do leito arterial. Cinco pacientes apresentaram placas com estenose com estenose significativa, sendo quatro (3, 6, 17, 23) entre 50 e 69% e apenas um (caso 11) com estenose superior a 70%. Esta paciente 11 evoluiu com deterioração neurológica ainda na fase aguda do AVC, atribuído a novo evento embólico sobre o mesmo território vascular. Foi indicada endarterectomia, porém a paciente faleceu sete dias após o segundo evento, antes de realizar a cirurgia.

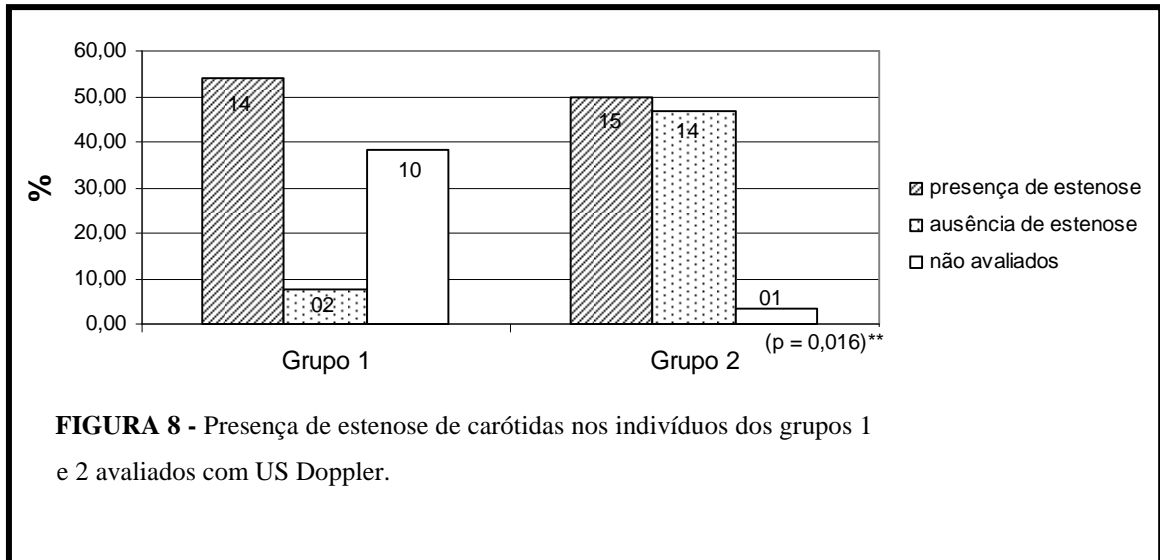
O quadro 7 descreve os achados da ultrassonografia de carótidas relacionados à presença de placa de ateroma e grau de estenose dos pacientes do grupo 2. No grupo 2, apenas o indivíduo número 14 não realizou ultrassonografia com Doppler das artérias carótidas e vertebrais porque faleceu antes da data do agendamento do exame. Dentre os demais indivíduos, 14 não apresentavam grau algum de estenose por placa de ateroma, 10 apresentavam estenose inferior a 50% e cinco apresentavam estenose superior a 69%. Até o final do período de acompanhamento nenhum paciente com estenose significativa havia sido submetido tratamento cirúrgico ou endovascular.

**QUADRO 7** – avaliação dos pacientes do grupo 2

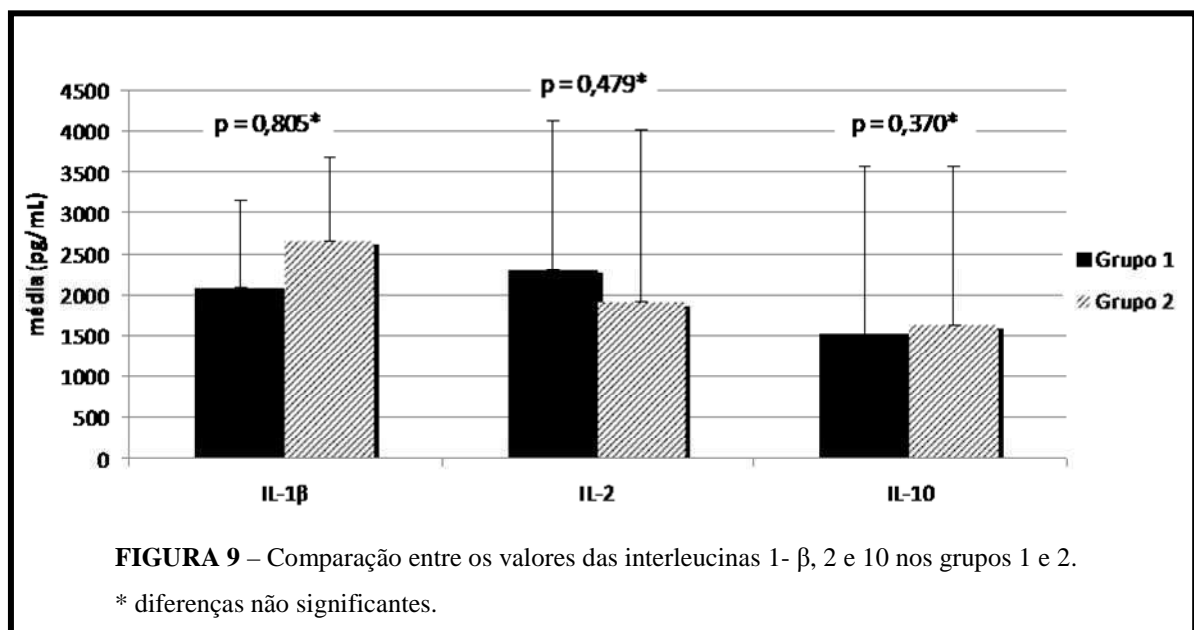
<b>No</b>	<b>grau de estenose pelo US de carótidas</b>	<b>evolução em 18 meses (<math>\pm 3</math>)</b>
1	estenose < 40%	AVC
2	estenose < 40%	AVC
3	não avaliado	Óbito (TEP)
4	sem estenose	Estável
5	estenose > 70%	Óbito (BCP + sepsis)
6	estenose < 40%	Óbito (IAM)
7	estenose < 69%	AVC / demência
8	estenose > 70%	Óbito (EAP)
9	estenose < 50%	Sem contato
10	estenose < 69%	Estável
11	estenose < 50%	AVC
12	sem estenose	IAM
13	sem estenose	Estável
14	sem estenose	Estável
15	estenose < 40%	IAM / ICC
16	estenose < 40%	Estável
17	sem estenose	Estável
18	sem estenose	Estável
19	sem estenose	Estável
20	sem estenose	Sem contato
21	sem estenose	Sem contato
22	sem estenose	Estável
23	sem estenose	Estável
24	estenose < 50%	Estável
25	estenose < 50%	Estável
26	sem estenose	Estável
27	sem estenose	Estável
28	sem estenose	Sem contato
29	estenose < 40%	Estável
30	estenose < 69%	AVC

US: ultrassonografia; Estável: estado clínico inalterado; TEP: tromboembolismo pulmonar; IAM: infarto agudo do miocárdio; AVC: acidente vascular cerebral; ICC: insuficiência cardíaca congestiva; EAP: edema agudo de pulmão; BCP: broncopneumonia.

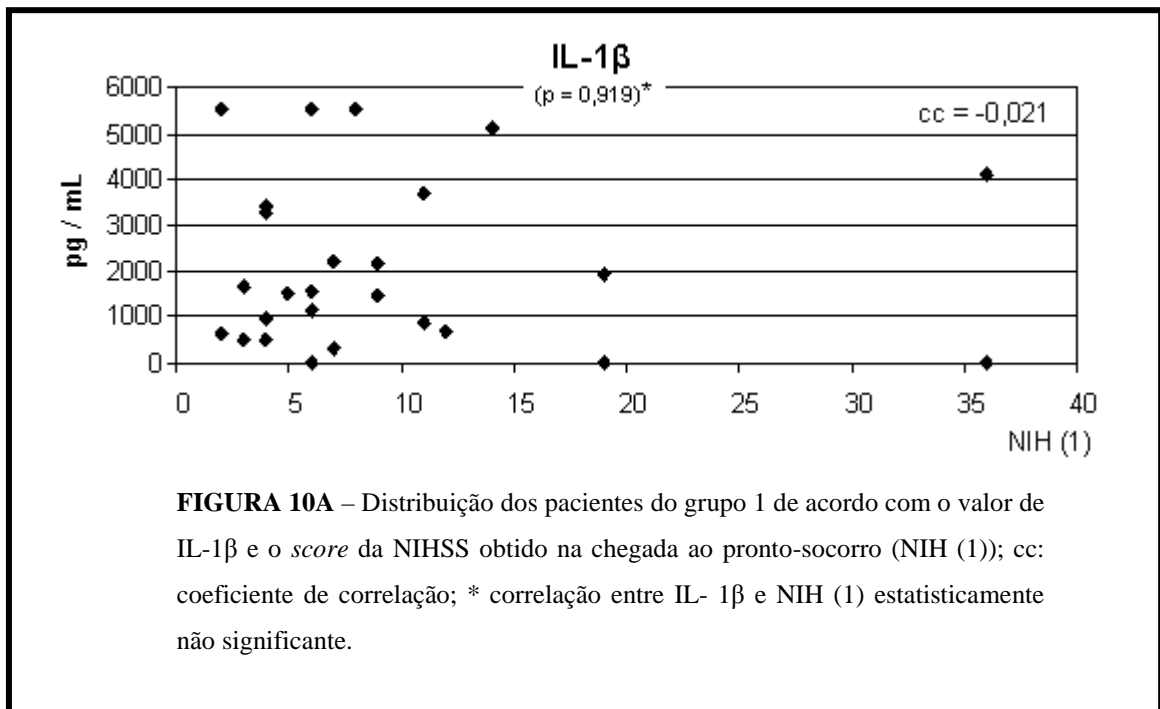
Em relação ao grupo 1 (fig 8), a frequência de estenose de carótidas de qualquer grau é menor e esta diferença entre os dois grupos é estatisticamente significativa ( $p = 0,016$ ).



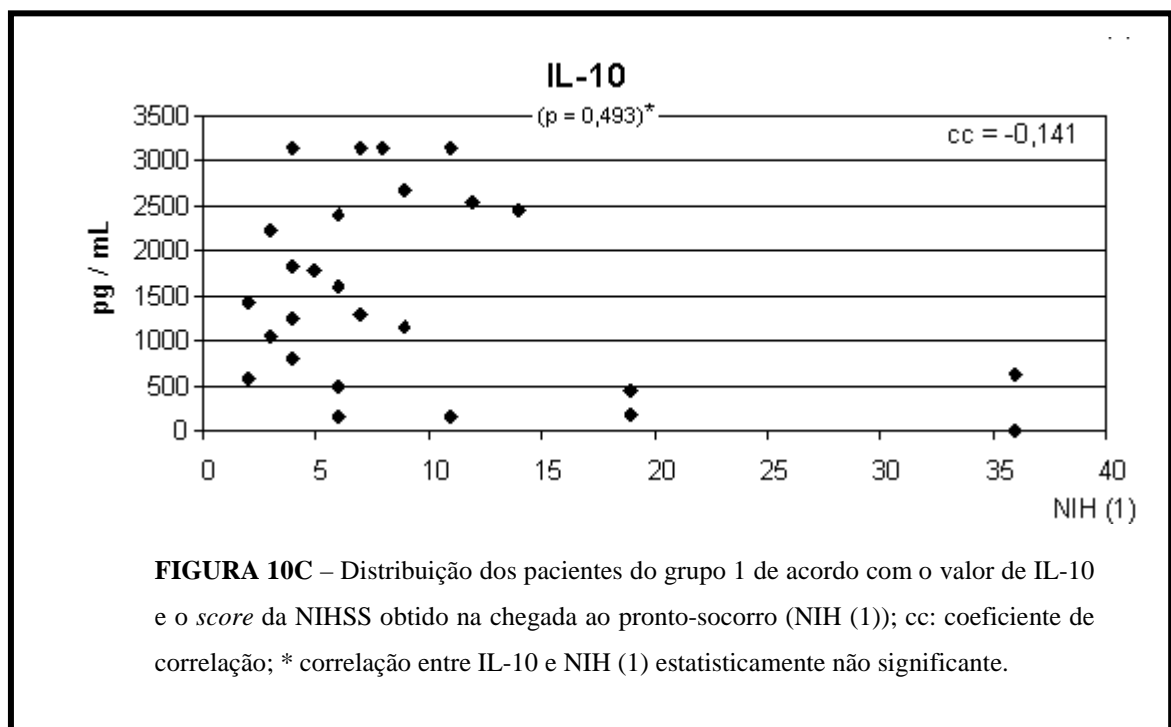
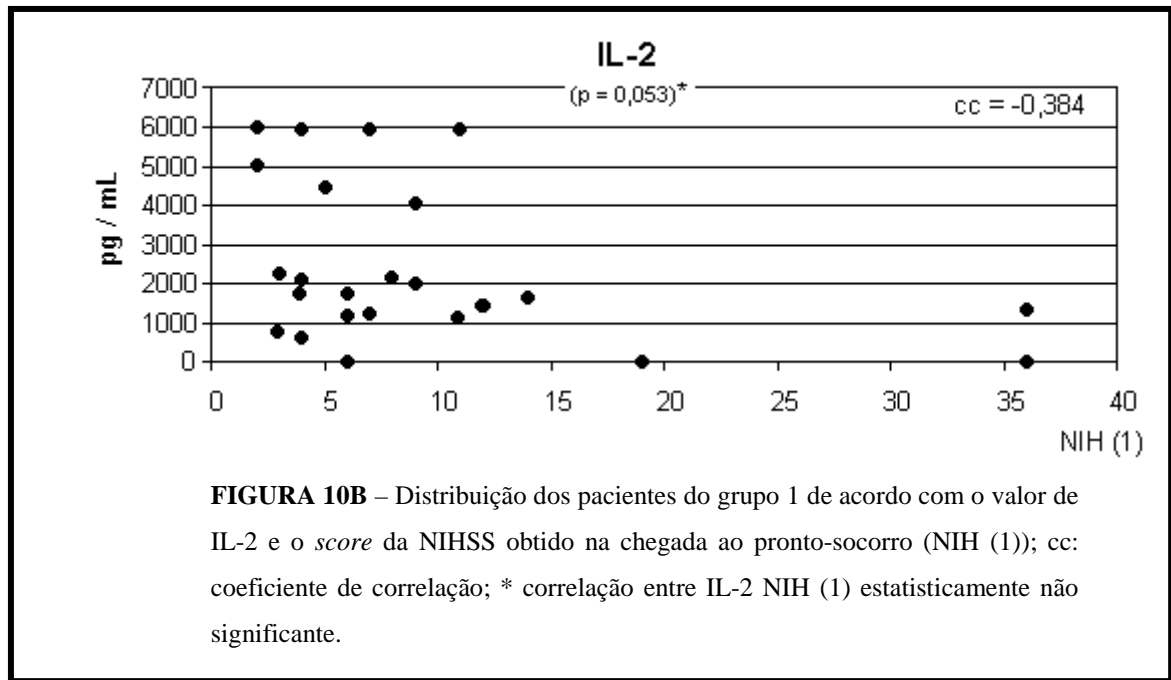
A figura 9 ilustra os valores das dosagens das interleucinas 1 $\beta$ , 2 e 10 obtidos para os dois grupos. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as dosagens das interleucinas IL-1 $\beta$ , IL-2 e IL-10 ( $p = 0,479$ ,  $0,370$  e  $0,805$  respectivamente) nos dois grupos estudados (tab. 6 em anexos).



Os valores utilizados como parâmetro para avaliar os pacientes do grupo 1 quanto ao déficit neurológico (NIHSS) na chegada ao pronto-socorro e após 72 horas de AVC estão descritos na tabela 7 (anexo). Os pacientes 2, 4, 9, 10, 12, 13, 20 e 25 foram admitidos com quadro de AVC leve (NIHSS = 0-4); já os casos 1, 3, 6, 8, 11, 14, 16, 17, 18, 19, 21, 23, 24 e 26 foram classificados como AVC moderado (NIHSS = 5-18) e os pacientes 5, 7, 15 e 22 apresentaram déficits neurológicos graves (NIHSS > 18) na chegada ao hospital (tab. 7-A em anexos). A correlação entre as dosagens das interleucinas 1 $\beta$ , 2 ou 10 no sobrenadante da cultura mononucleares e a gravidade do AVC na admissão hospitalar (tab. 8 em anexos, fig. 10) não apresentou correlação estatisticamente significativa ( $p = 0,919$ , 0,053 e 0,493 respectivamente).

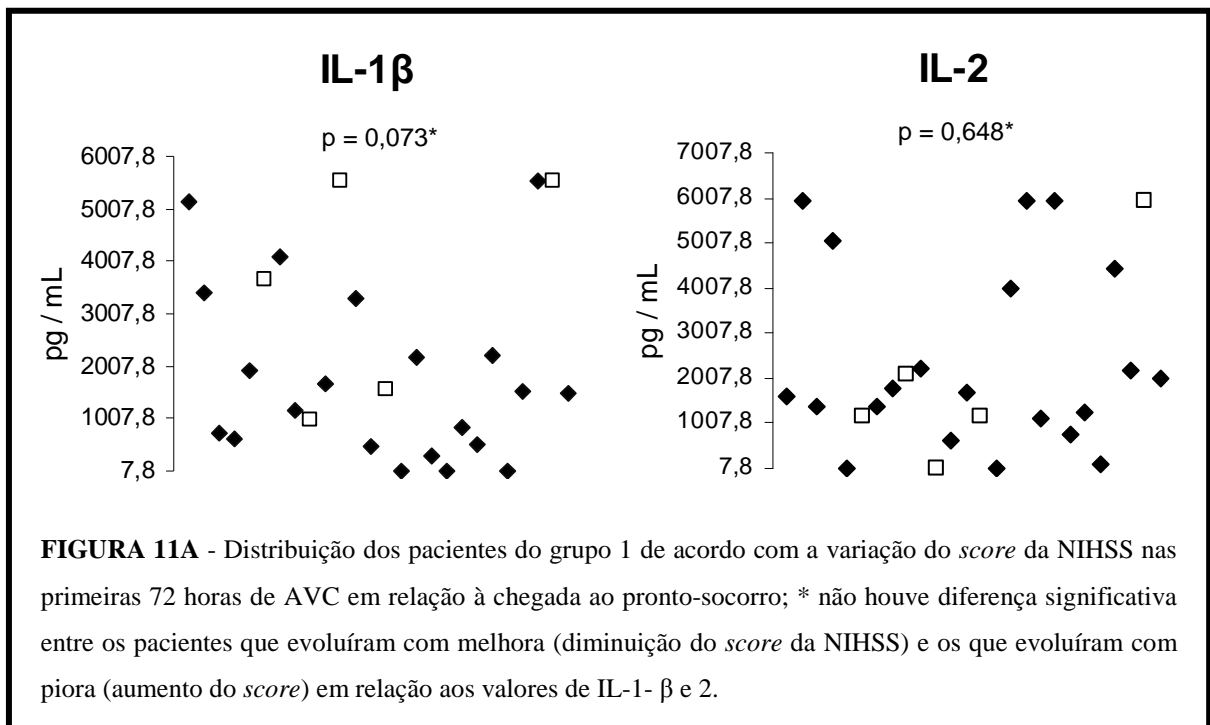


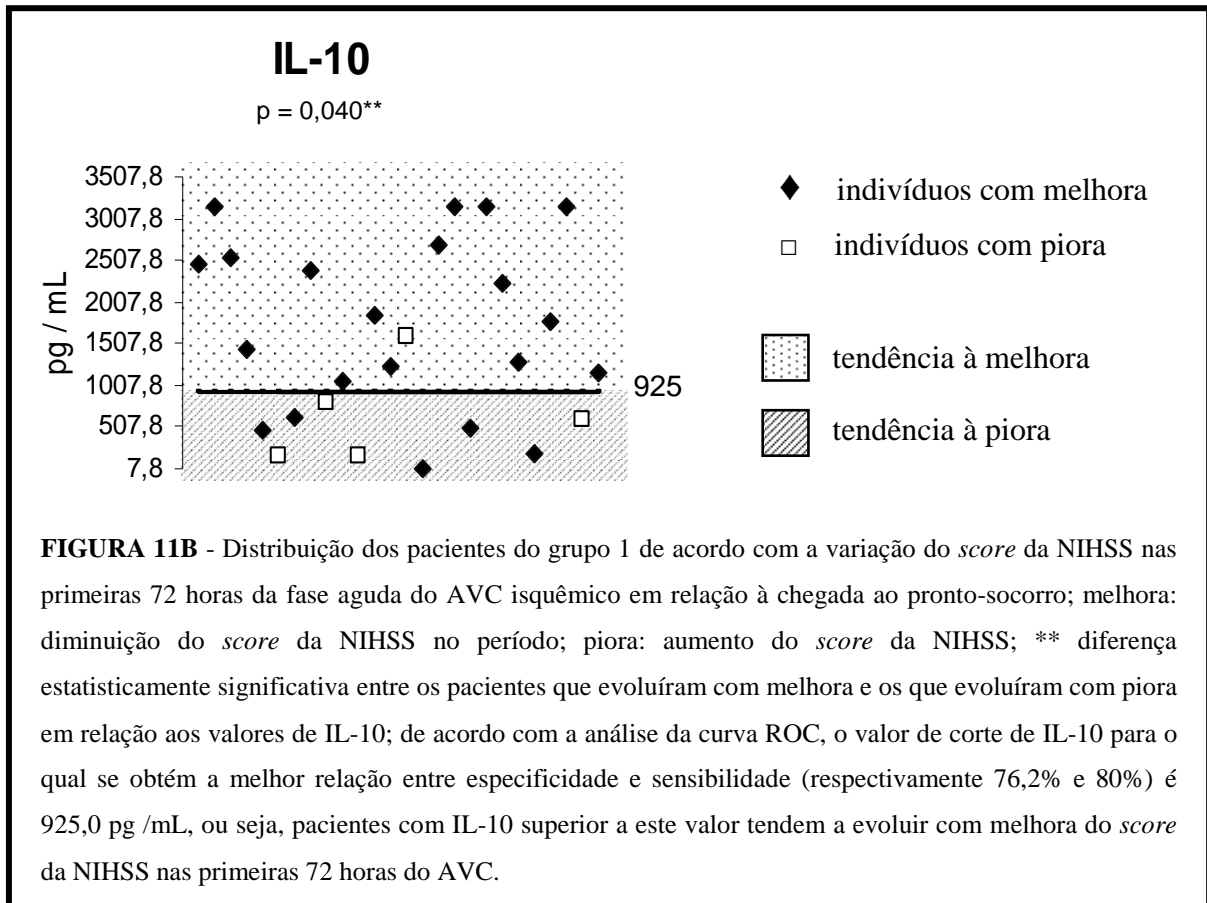




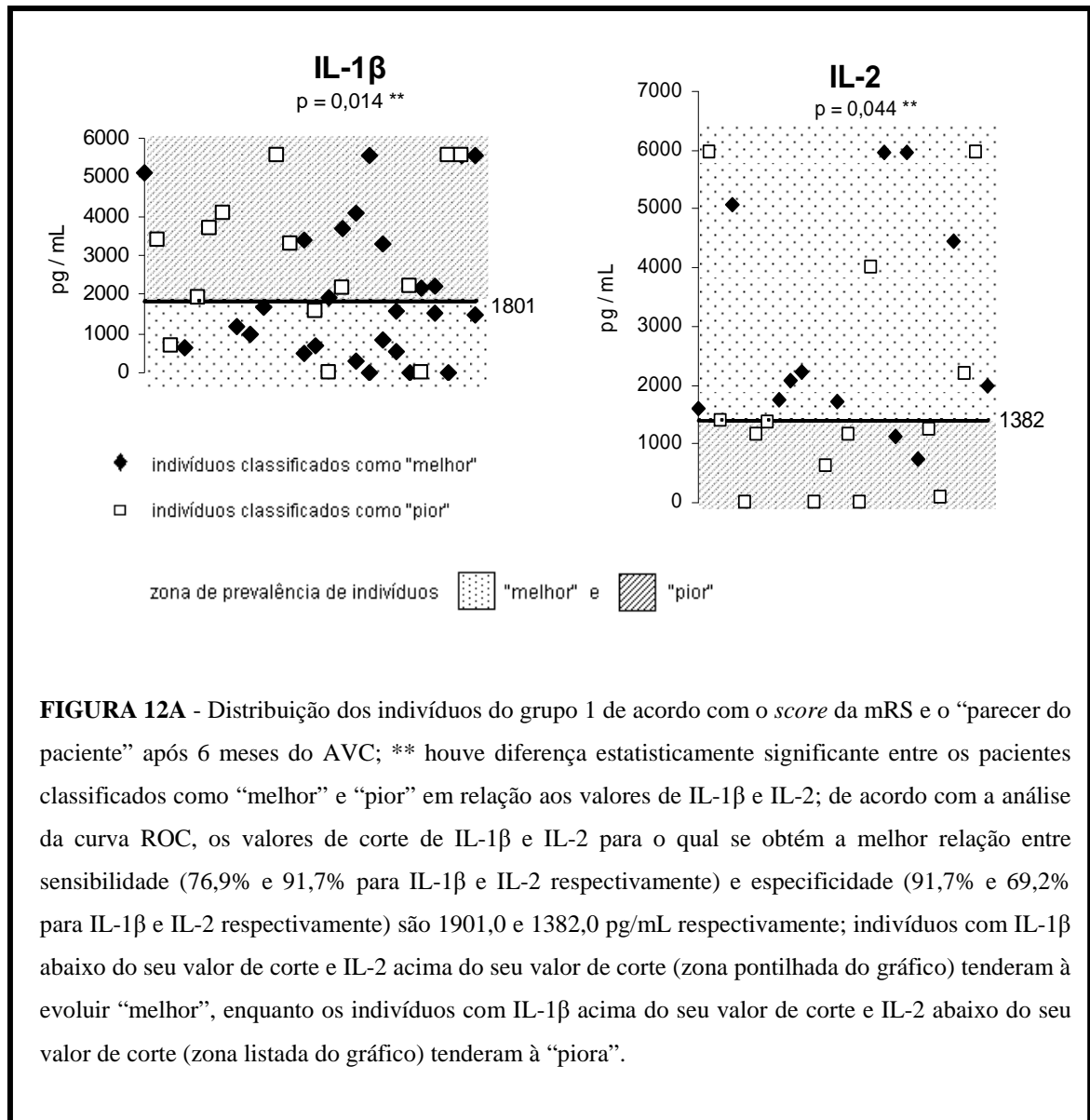
Os pacientes 6, 9, 11, 14 e 25 evoluíram com piora do déficit neurológico nas primeiras 72 horas do AVC, caracterizada por um aumento do *score* da NIHSS em relação ao *score* da chegada ao pronto-socorro (tab. 7-B em anexos). Os 21 pacientes restantes tiveram uma evolução estável, caracterizada por manutenção do *score* de chegada (pacientes 2, 3, 4, 5, 7, 10, 12, 13, 15, 17, 18, 22, 23 e 26) ou sua redução (1, 8, 16, 19, 20, 21 e 24). A tabela 9 (anexo) mostra que em relação aos níveis de IL-10, mas não aos de IL-1 $\beta$  e IL-2, houve uma diferença significativa ( $p = 0,040$ ) entre os pacientes com melhora ou estabilidade da NIHSS

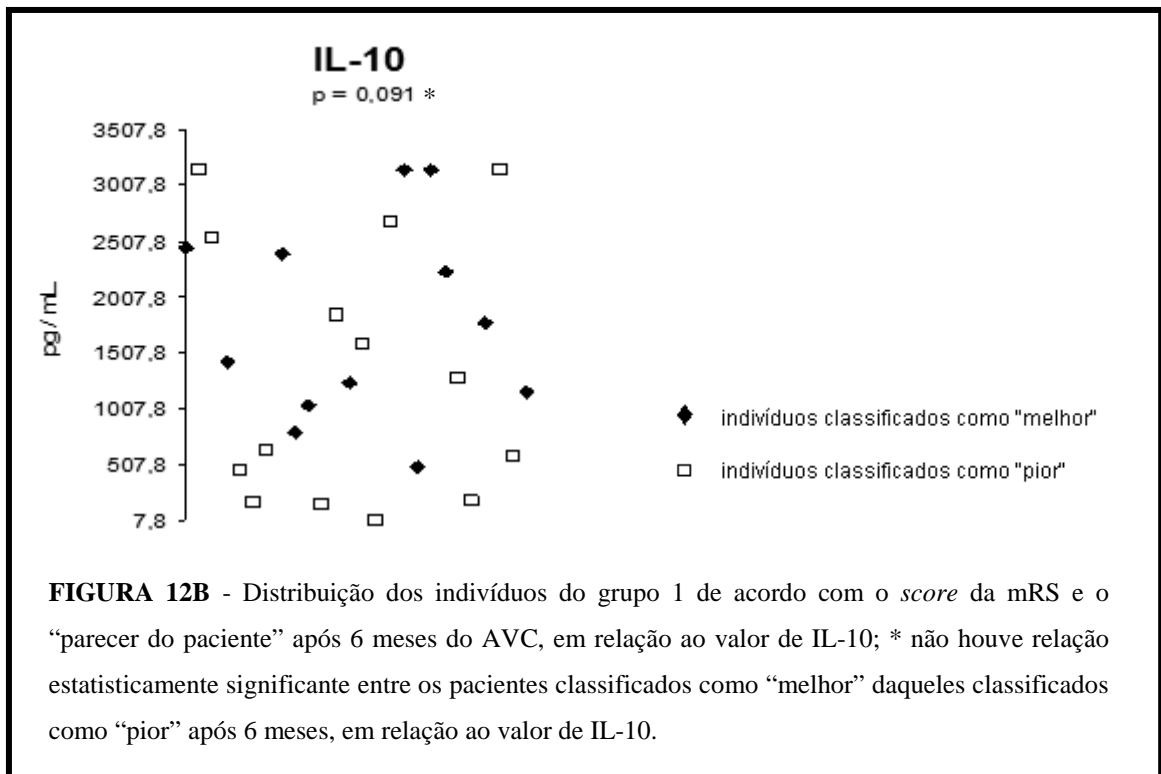
nas primeiras 72 horas do AVC e os pacientes com deterioração neurológica (fig. 11). A análise da curva ROC mostra que o valor de IL-10 que distingue os pacientes com melhora daqueles com piora ou estabilidade do *score* da NIHSS, com melhor relação entre sensibilidade e especificidade (respectivamente 76,2% e 80%), é de 925,0 pg/mL. Ou seja, este valor pode ser utilizado como corte para classificar os pacientes do grupo 1 em um subgrupo com tendência à melhora e outro subgrupo com tendência à piora do déficit neurológico nas primeiras 72 horas da fase aguda do AVC isquêmico (tab. 10 em anexos). Desta forma, pacientes com IL-10 superior a 925,0 têm maior propensão a evoluírem com melhora do déficit neurológico nas primeiras 72 horas do AVC (fig. 11B).



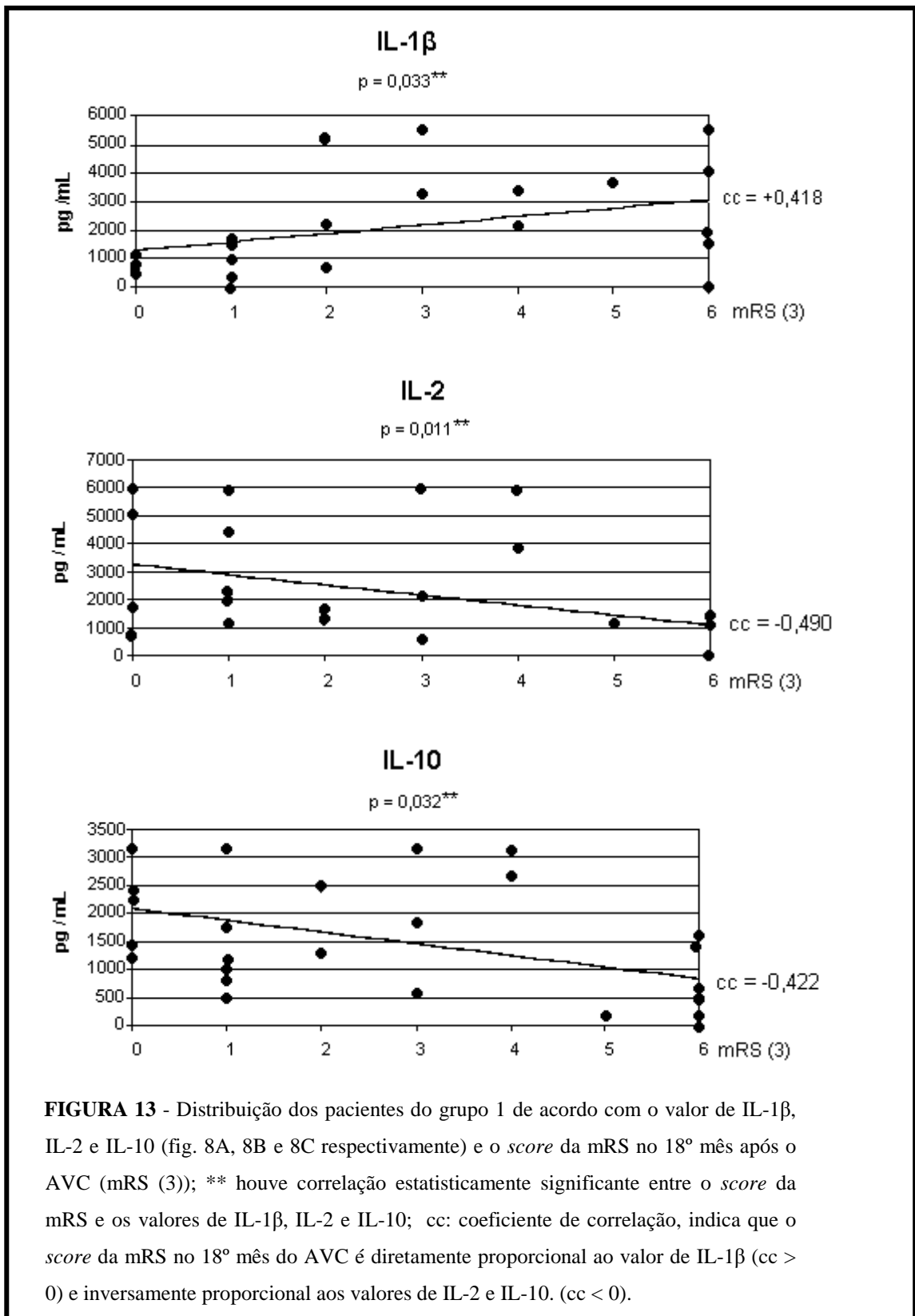


A avaliação clínica segundo contato telefônico e a escala de mRS está descrita na tabela 11 (anexos). Foram classificados como “pior” após seis meses os casos 2, 3, 5, 6, 7, 11, 12, 14, 15, 16, 21, 22, 24 e 25; conseqüentemente, os casos 1, 4, 8, 9, 10, 13, 17, 18, 19, 20, 23 e 26 evoluíram “melhor” (tab. 11 em anexos). A tabela 12 (anexo) mostra que existe uma correlação estatisticamente significante entre a evolução neurológica em 6 meses e os valores de IL-1 $\beta$  e IL-2 ( $p = 0,014$  e  $0,044$  respectivamente), mas não de IL-10 ( $p = 0,091$ ). Pacientes com valores de IL-1 $\beta$  e IL-2 respectivamente superior a 1800,788 e inferior a 1381,815 pg/mL tenderam à “piora” após seis meses, de acordo com a análise da curva ROC (respectivamente tab. 11 e 14, fig 12).

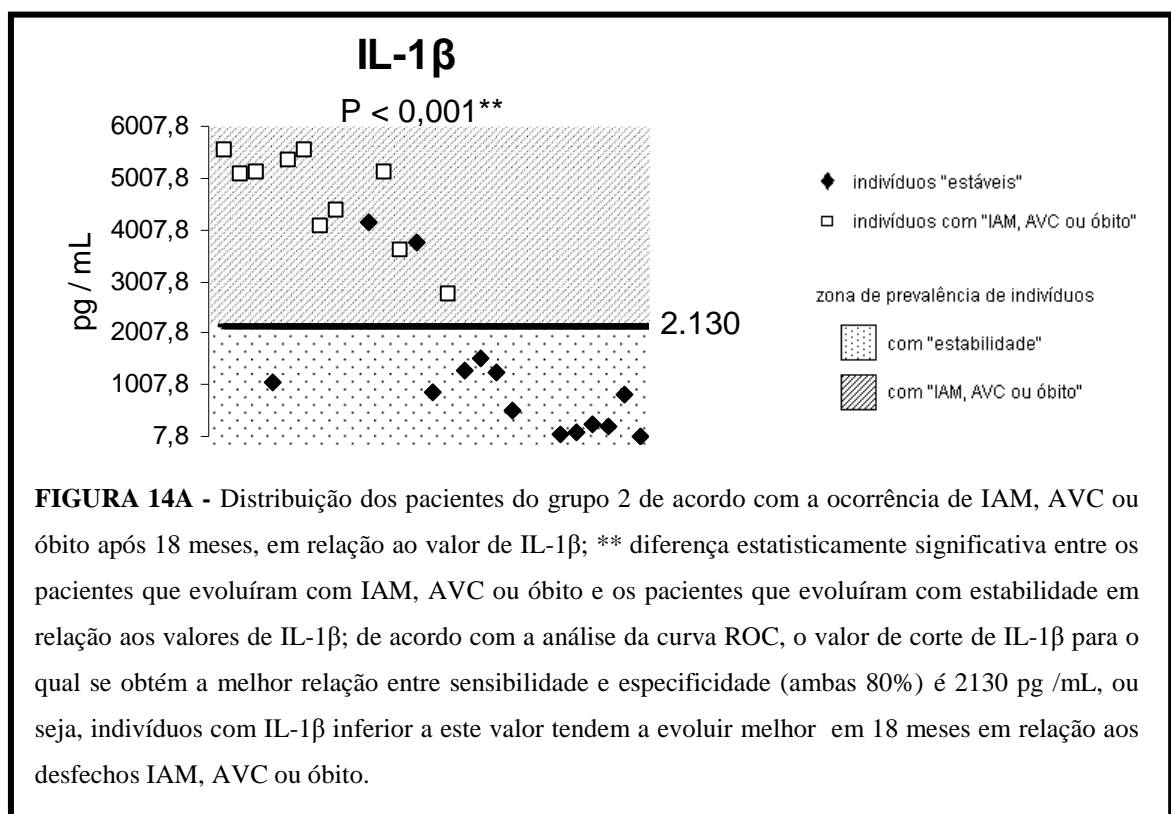


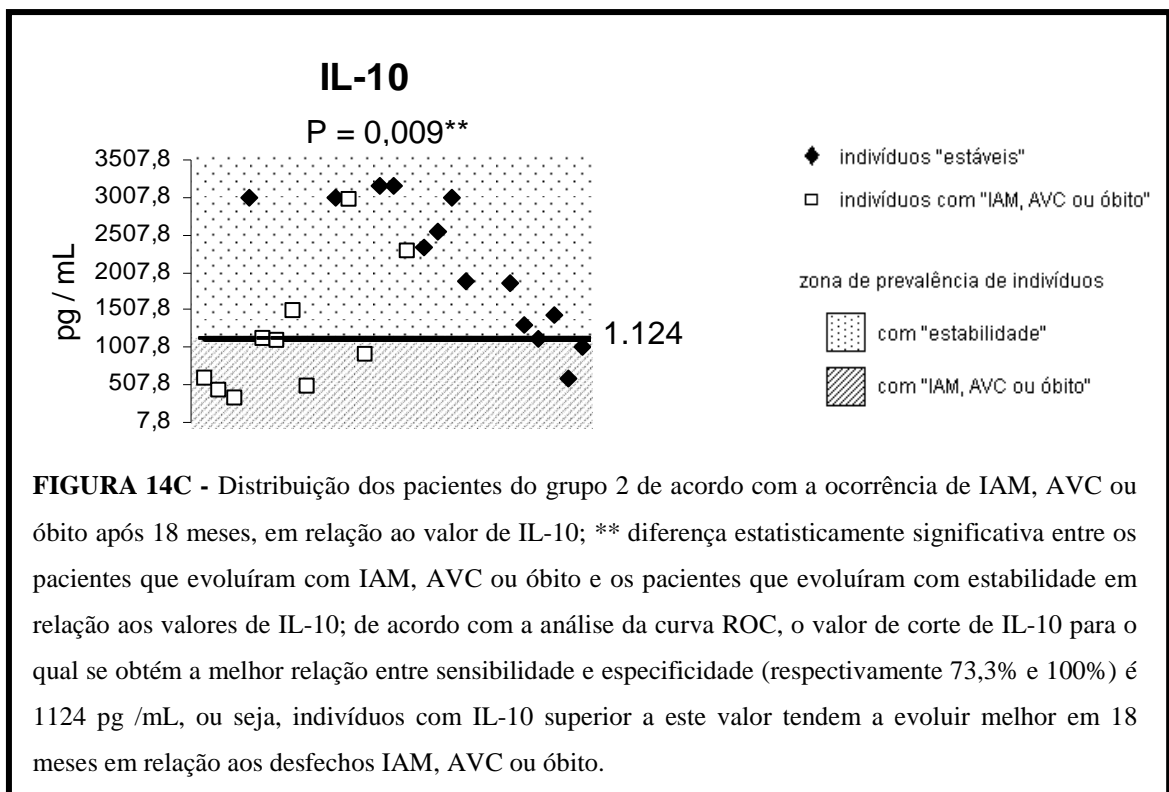
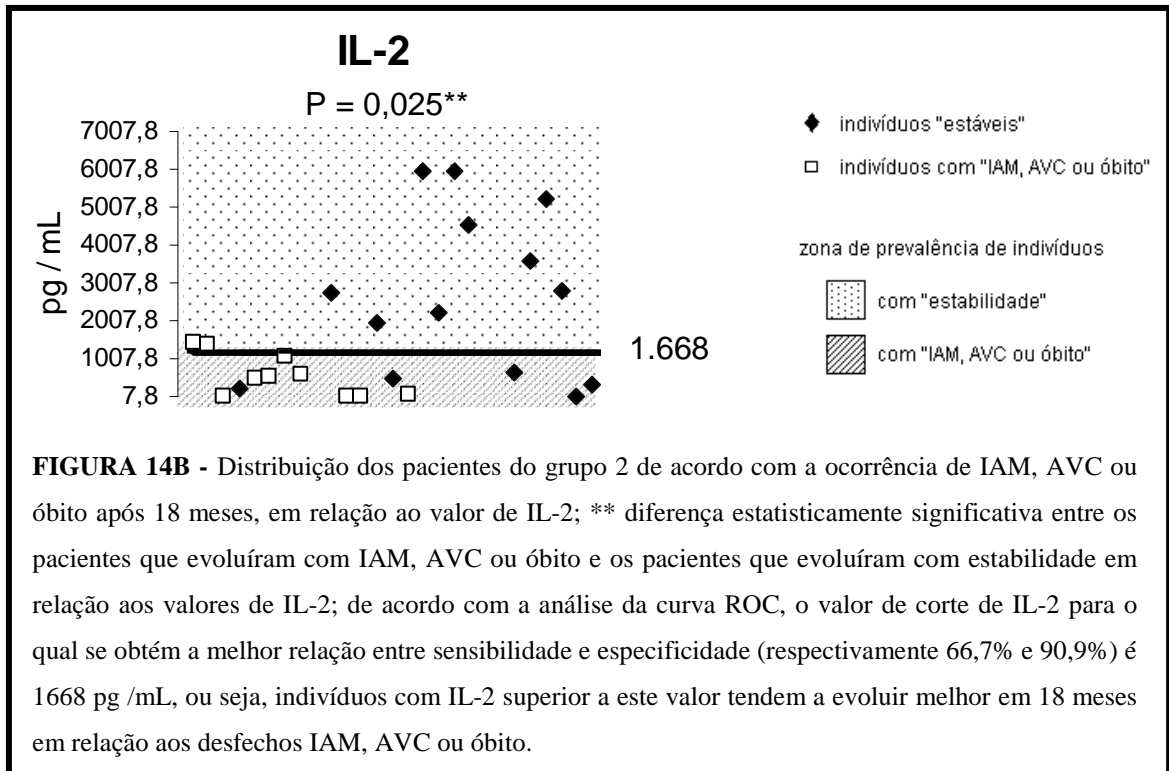


A tabela 15 (anexo) mostra que existe correlação significativa entre os valores de IL-1 $\beta$ , IL-2 e IL-10 e o *score* da mRS após 18 meses de AVC ( $p = 0,033$ ;  $0,011$  e  $0,032$  respectivamente). Enquanto os valores de IL-2 e IL-10 correlacionam-se inversamente (coeficiente de correlação =  $-0,490$  e  $-0,422$  respectivamente) ao *score* da mRS, a IL-1 $\beta$  apresenta uma correlação direta (coeficiente de correlação =  $+0,418$ ), ou seja, quanto maior o valor de IL-1 $\beta$ , maior será o *score* da mRS e quanto menor os valores de IL-2 e IL-10 menor será o comprometimento funcional segundo esta escala (fig. 13).



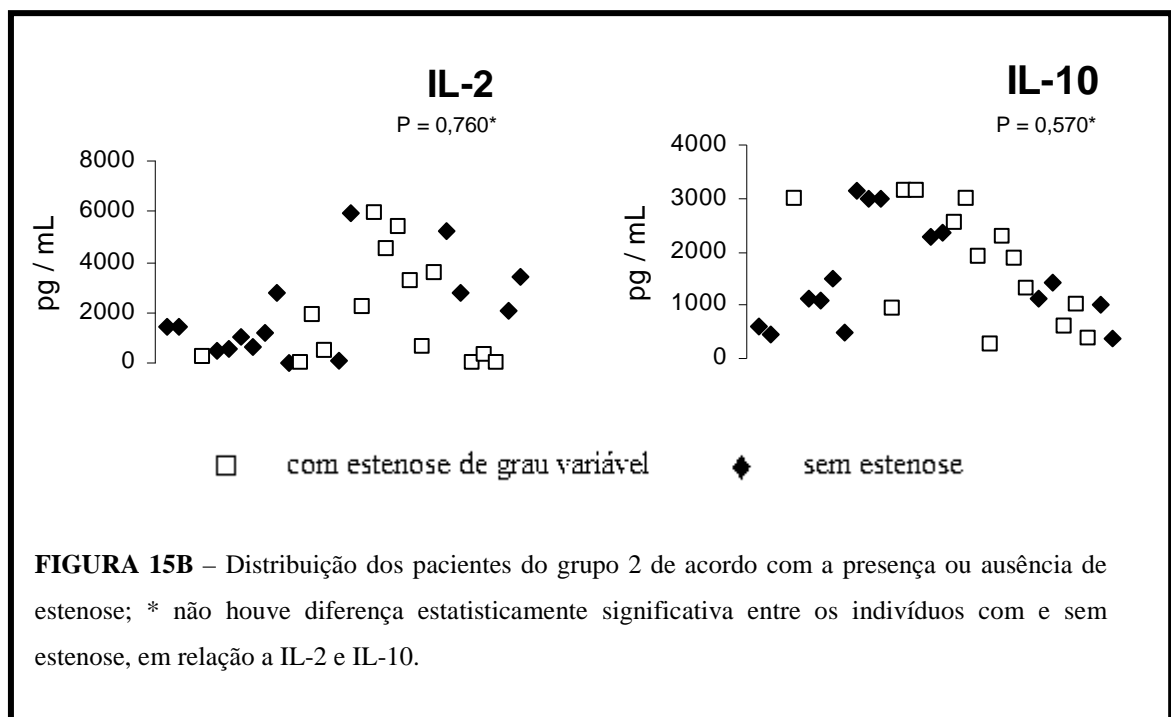
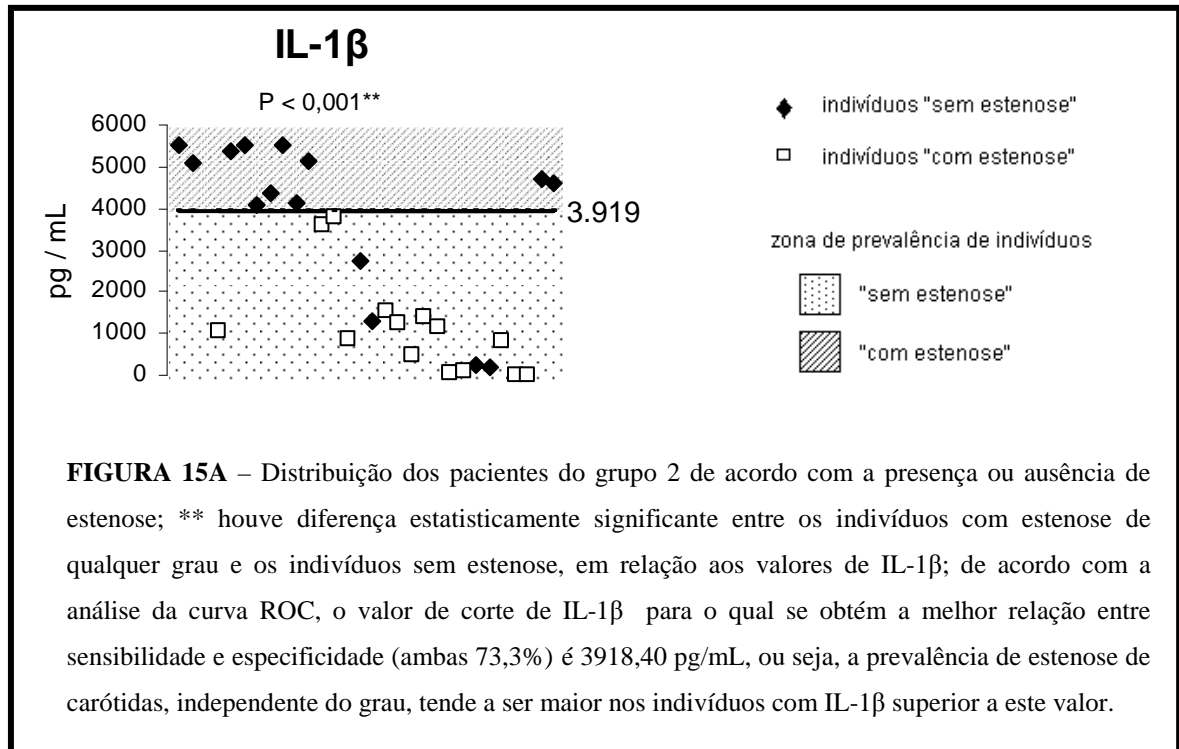
Dos 30 pacientes que constituem o grupo controle, quatro perderam seguimento e não foram localizados ao final do período de 18 meses. Do restante, 15 foram classificados como “estáveis” e 11 evoluíram com AVC (casos 1, 2, 7, 11 e 30), IAM (casos 6, 12 e 15) e quatro com óbito (casos 3, 5, 6 e 8). A tabela 16 (anexo) mostra que houve diferença estatisticamente significativa entre os indivíduos classificados como “estáveis” após 18 meses e aqueles com AVC, IAM ou óbito, em relação aos valores de IL-1 $\beta$ , IL-2 e IL-10 ( $p < 0,001$ ,  $p = 0,025$  e  $0,009$  respectivamente). De acordo com a análise da curva ROC, os valores de IL-1 $\beta$ , IL-2 e IL-10 que distinguem estes dois subgrupos de pacientes, com melhor relação entre sensibilidade e especificidade, são respectivamente 2.130,0 pg/mL, superior a 1668,0 pg/mL e superior a 1.124,0 pg/mL (respectivamente tab. 17, 18 e 19, em anexos). Pacientes “estáveis” são mais frequentes dentre os indivíduos com IL-1  $\beta$ , IL-2 e IL-10 respectivamente inferior a 2.130,0 pg/mL, superior a 1668,0 pg/mL e superior a 1.124,0 pg/mL (fig. 14). (, fig. 14).







Dentre as três interleucinas estudadas, a IL-1 $\beta$  foi a única que apresentou correlação estatisticamente significativa ( $p = 0,001$ ) com a presença de estenose das artérias carótidas de qualquer grau (tab. 20 em anexos). A análise da curva ROC mostrou que o valor de corte estimado em 3.919,0 pg/mL. Ou seja, indivíduos do grupo 2 que apresentaram IL-1 $\beta$  superior a 3919,0 pg/mL apresentam algum grau de estenose carotídea (tab. 21 em anexos, fig. 15-A).



## 5. DISCUSSÃO

Citocinas são glicoproteínas de baixo peso molecular produzidas por células do sistema imunológico, além de outros tipos celulares, em resposta a vários estímulos. Participam não apenas da homeostase normal do sistema imunológico, inflamação e resposta do hospedeiro contra agentes infecciosos, mas também estão envolvidas na patogênese de uma grande variedade de doenças, incluindo câncer, processos autoimunes e alérgicos.

Nos últimos anos, acumulam-se evidências que associam a atividade inflamatória ao desenvolvimento da isquemia cerebral. A presença de citocinas como IL-1 $\beta$ , IL-2 e IL-10 é detectada no cérebro e líquido cefalorraqueano de pacientes com AVC isquêmico agudo.<sup>57</sup> Por outro lado, a relevância dos valores detectados em sangue venoso periférico ainda não está bem estabelecida. Emsley et al (2007), estudando a ativação de genes de citocinas no sangue periférico, verificaram que as citocinas encontradas no soro após o AVC isquêmico provavelmente têm origem no tecido cerebral.<sup>38</sup> Estas citocinas, supostamente produzidas pela microglia no tecido cerebral em resposta à isquemia, atingem a circulação periférica via reabsorção líquórica. Ainda assim, é possível que processos inflamatórios sistêmicos ou localizados em outros órgãos periféricos contribuam para um estado inflamatório pré-existente ao AVC. A exclusão de pacientes com tais diagnósticos tende a evitar esta interferência. Infecções respiratórias e/ou urinárias subseqüentes ao AVC são frequentes, contribuem para o aumento dos níveis séricos de citocinas e também estão associadas à deterioração neurológica precoce.<sup>66</sup> Para evitar este fator de confusão, é fundamental o recrutamento precoce dos pacientes, pois a chance de desenvolverem infecções aumenta com o tempo após a instalação do AVC. Dentre os casos incluídos, não havia sido detectada infecção em nenhum dos pacientes até o momento da coleta. Os pacientes 5 e 22 evoluíram com pneumonia após a coleta e ambos faleceram. Não é possível desconsiderar, particularmente no paciente 22 em que a coleta do sangue foi tardia (39 horas de AVC), a possível interferência da infecção sobre os valores das interleucinas e o desfecho clínico. Entretanto, não é possível excluir a possibilidade de infecção subclínica quando a coleta ocorreu em tempo superior a 24 horas de AVC (pacientes 4, 14 e 16).<sup>67</sup>

Neste contexto, a aterosclerose também pode atuar como fator de confusão na tentativa de se estabelecer um mediador inflamatório como marcador de isquemia cerebral. De fato, os valores das dosagens das citocinas dos pacientes com isquemia cerebral aguda (grupo 1) foram estatisticamente semelhantes aos dos pacientes com risco para AVC, sem

isquemia cerebral (grupo 2). Não foi possível, portanto, determinar se as taxas de IL-1 $\beta$ , 2 e 10 encontrados nos pacientes do grupo 1 foram induzidos pelo AVC ou se indicam uma condição pré-existente que pode ter contribuído para o desenvolvimento do AVC. Este dilema é freqüente na literatura.<sup>67</sup>

A produção de citocinas em humanos, sistêmica ou local, não ocorre espontaneamente.<sup>68</sup> Entretanto a diversidade de estímulos capaz de induzir a síntese de citocinas é grande, o que dificulta a constituição de um grupo controle. Mesmo indivíduos jovens, sadios e presumidamente livres de fatores de risco para AVC isquêmico estão naturalmente expostos a estímulos que podem alterar a expressão de mediadores imunológicos em geral. A grande variabilidade dos valores de IL-1 $\beta$ , IL-2 e IL-10 nos dois grupos provavelmente reflete a diversidade de estímulos imunológicos ambientais a que cada paciente está exposto.

Estabelecer uma relação de causa e efeito requer um estudo bem mais complexo, com pareamento entre casos e controles de acordo com o grau de aterosclerose, além da idade e sexo. Inicialmente os dois grupos foram estratificados em subgrupos homogêneos de acordo com o tipo de AVC pelo critério *Toast* (aterotrombótico, lacunar ou cardioembólico), a gravidade do AVC de acordo com o NIHSS (até 4 ou leve, entre 5 e 18 ou moderado e grave ou superior a 18) e ao grau de aterosclerose carotídea de acordo com a ultrassonografia com Doppler (ausente, estenose inferior a 50%, entre 50 e 70% ou maior que 70%). Entretanto, o tamanho da amostra não foi estatisticamente significativo para permitir a análise destes subgrupos. Esta heterogeneidade de cada amostra dificultou a comparação entre os dois grupos. Aliás, Vila et al (2003) mostraram que os diferentes subtipos de AVC (*Toast*) apresentam níveis de IL-10 semelhantes entre si<sup>58</sup>. Este dado indica que a heterogeneidade do grupo 1 em relação aos subtipos do AVC pode ser irrelevante para esta citocina.

Nenhum dos dois grupos foi avaliado por exame de neuroimagem ao final do seguimento de 18 meses para confirmar a natureza isquêmica naqueles que evoluíram com AVC neste período e para excluir isquemia silenciosa nos demais. Considerando que a atividade inflamatória exacerbada pode estar associada também à isquemia silenciosa<sup>69</sup>, os resultados da correlação entre as dosagens de IL-1 $\beta$ , IL-2 e IL-10 e a evolução após 18 meses de seguimento perde em precisão.

Os valores de IL-10 foram significativamente maiores nos pacientes do grupo 1 que permaneceram estáveis ou melhoraram durante as primeiras 72 horas em relação aos pacientes deste mesmo grupo que evoluíram com deterioração neurológica segundo a NIHSS. Estes resultados estão de acordo com outros estudos da literatura.<sup>58</sup> A dosagem de IL-10 não

apresentou correlação com a gravidade do AVC segundo a NIHSS aplicada no momento de chegada do paciente ao hospital, resultado semelhante ao obtido por Basic Kes et al (2008)<sup>70</sup>.

De fato roedores deficientes em IL-10 desenvolvem infartos cerebrais maiores e o tratamento com IL-10 exógena a esses animais reduz o tamanho da lesão.<sup>71,72</sup> A indução da atividade da IL-10 por meio da tolerância oral com proteína básica de mielina também está associada à redução do tamanho do infarto em ratos.<sup>73</sup> A transferência de genes que codificam IL-10 também é possivelmente benéfica.<sup>74</sup> Este suposto efeito protetor da IL10 contra a isquemia cerebral é provavelmente resultado de suas ações anti-inflamatórias, capaz de reduzir a expressão de mediadores deletérios tais como IL-6<sup>75</sup> e fator  $\alpha$  de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ).<sup>76</sup>

A IL-10 representou fator de proteção ao final do período de 18 meses de seguimento tanto para o grupo 1 quanto para o grupo 2 (controles). Embora não tenha sido excluída isquemia silenciosa em nenhum dos indivíduos que evoluíram sem AVC neste período, os dados estão de acordo com o estudo de Van Exel et al (2002), pelo qual demonstrou-se que níveis de baixa produção de IL-10 podem representar maior risco para AVC isquêmico em humanos saudáveis.<sup>77</sup> Entretanto, a relação direta entre baixa produção de IL-10 e pior prognóstico neurológico não pode ser extrapolada a partir destes resultados, pois a dosagem desta citocina não foi determinada em momento próximo ao da deterioração clínica.

A dosagem de IL-1 $\beta$  não mostrou correlação com a gravidade do AVC, quantificada segundo a NIHSS aplicada no momento de chegada do paciente ao serviço de emergência. Não houve também correlação com a evolução neurológica durante a fase aguda, avaliada segundo a variação do *score* nas primeiras 72 horas do AVC. Estes dados desqualificam a IL-1 $\beta$  como possível parâmetro de avaliação da extensão da lesão e do prognóstico na fase aguda do AVC isquêmico pelo método utilizado no estudo.

Além da associação com piora funcional após seis e 18 meses, a dosagem elevada de IL-1 $\beta$  foi correlacionada com maior risco de eventos isquêmicos até o final do período de seguimento, tanto no grupo dos pacientes com AVC quanto nos controles. Entretanto, os valores de IL-1 $\beta$  encontrados nos dois grupos estudados foram semelhantes, ou seja, tal como a IL-10, não foi possível definir se os valores de IL-1 $\beta$  encontrados para o grupo 1 refletem as conseqüências do evento isquêmico ou um estado anterior a ele. Considerando que outros fatores não avaliados no estudo, tais como a adesão a um programa de reabilitação, podem influenciar a recuperação funcional dos pacientes com seqüela de AVC, é mais provável que os altos níveis de IL-1 $\beta$  encontrados nos indivíduos que evoluíram mal representem um fator de risco pré-existente do que uma conseqüência da isquemia.

Esta hipótese encontra suporte na literatura. De acordo com Emsley et al (2007)<sup>38</sup> e Sotgiu et al (2006)<sup>78</sup> não há aumento de IL-1 durante o AVC isquêmico em humanos, possivelmente em razão da ativação precoce de um sistema com ação anti-inflamatória capaz de bloquear a produção de IL-1 em resposta à isquemia. O aumento de IL-1ra precoce no AVC isquêmico pode ser uma evidência da ativação deste sistema.<sup>38</sup> A diminuição da resposta à estimulação com lipopolissacarídeos (LPS) corrobora esta hipótese. De fato, a produção *in vitro* de citocinas inflamatórias por células de pacientes com AVC isquêmico estimuladas com lipopolissacarídeos (LPS) é menor em relação aos controles e inversamente relacionada com o prognóstico do AVC.<sup>38</sup>

Os resultados destes estudos em pacientes com AVC isquêmico diferem de estudos anteriores com animais baseados em modelos experimentais de isquemia cerebral. Existem na literatura vários estudos em animais mostrando correlação entre IL-1 $\beta$  e isquemia cerebral permanente ou temporária, com valores diretamente proporcionais à gravidade ou tamanho da lesão.<sup>79,80,52,81,55</sup> Entretanto, o exato mecanismo pelo qual a IL-1 influencia a propagação da lesão isquêmica não está claro. Alguns autores atribuem o possível efeito deletério da IL-1 no AVC à sua capacidade de induzir a expressão de moléculas de adesão no endotélio cerebral, favorecendo o influxo de neutrófilos.<sup>48</sup> Deste modo, a IL-1 atuaria indiretamente induzindo um estado pró-trombótico sobre o endotélio a zona de penumbra isquêmica.

A dosagem de IL-2 mostrou um comportamento protetor. Correlacionou-se com evolução “melhora” no seguimento em seis meses do AVC e melhora funcional ou redução do risco de eventos isquêmicos em 18 meses, tanto para o grupo controle quanto para os pacientes com AVC. A relação entre IL-2 e AVC isquêmico é pouco estudada. Sabe-se que a IL-2 está presente no cérebro normal em camundongos e que sua concentração diminui durante a os primeiros dias após a indução da isquemia. Entretanto, a suplementação com IL-2 exógena, administrada no líquido não altera a evolução da isquemia cerebral em animais.<sup>51</sup>

Considerando sua ação pró-inflamatória, seria esperado algum efeito deletério desencadeado pela IL-2 presumidamente atribuído ao estado pró-trombótico associado à inflamação. Aliás, o uso de IL-2 em humanos como quimioterapia contra câncer está associado à disfunção cognitiva, refletindo sua ação predominantemente sobre o hipocampo onde os IL-2R estão concentrados.<sup>82</sup>

A associação entre IL-2 e boa evolução nos dois grupos após 18 meses de seguimento contraria dados da literatura. A IL-2 participa do processo de aterogênese promovendo o desenvolvimento da placa de ateroma<sup>83-85</sup>, ou seja, esperava-se que seu efeito inflamatório comprometesse o prognóstico destes pacientes.

## 6. CONCLUSÕES

1. A gravidade do déficit neurológico, segundo a NIHSS aplicada na chegada do paciente com AVC isquêmico ao pronto-socorro, não apresentou correlação com as dosagens de IL-1 $\beta$ , IL-2 e IL-10 no sobrenadante da cultura de células mononucleares.
2. Valores de IL-10 no sobrenadante da cultura de células mononucleares apresentaram correlação com a recuperação do déficit neurológico nas primeiras 72 horas da fase aguda do AVC isquêmico, segundo a NIHSS.
3. Valores elevados de IL-1 $\beta$  em sobrenadante de cultura de células mononucleares, nas primeiras horas da fase aguda do AVC isquêmico, apresentaram correlação com a piora da incapacidade funcional, segundo a mRS aplicada após 18 meses. Inversamente, valores elevados de IL-2 e IL-10 foram correlacionados com a diminuição da incapacidade funcional, segundo a mRS aplicada após 18 meses.
4. Valores elevados de IL-1 $\beta$  em sobrenadante da cultura de células mononucleares foram associados à maior incidência de IAM, AVC ou óbito após 18 meses, em pacientes com risco para AVC isquêmico. Inversamente, IL-2 e IL-10 elevados foram associados à menor frequência de IAM, AVC ou óbito após 18 meses.

## 7. ANEXOS

**TABELA 1 – descrição dos pacientes com diagnóstico de AVC isquêmico agudo, incluídos no grupo 1.**

No	Sexo	idade (anos)	Comorbidades	Toast	grau de estenose pelo US de carótidas
1	F	68	O, HAS	1A	< 40%
2	M	77	C, AIT, H, HAS	1A	< 40%
3	M	51	HAS, T, IAP	1B	< 69% (calcificada)
4	F	31	FOP, TG, T, S	3	Normal
5	F	75	HAS, C, TG	1A	Não avaliado
6	F	70	HAS, DM, AVC	1B	< 59% (calcificada)
7	M	61	TG, O	1A	Não avaliado
8	M	67	HAS, DM	1A	15-49%
9	M	61	T, TG	2	Não avaliado
10	M	64	HAS, DM, T	2	Não avaliado
11	F	51	HAS, T, S	1B	> 80% (trombo vermelho)
12	M	80	HAS, O	2	< 40%
13	F	75	HAS, S	2	Normal
14	M	64	Aa, HAS, T	3	Não avaliado
15	F	84	HAS, Ac, ICC	3	Não avaliado
16	M	59	HAS, T	1A	Não avaliado
17	M	67	HAS, AVC	1B	50-69%
18	M	63	DM, S	1A	< 40%
19	M	59	T, HAS	1A	< 40%
20	F	46	T, S	1A	Não avaliado
21	F	74	S, HAS	1A	Não avaliado
22	F	81	Ac, HAS, S	3	Não avaliado
23	F	58	DM, HAS, C, S	1B	50-69%
24	F	75	HAS, C, AVC	1A	15-49%
25	F	86	DM, S, O, HAS	1A	15-49%
26	F	57	HAS, DM, IAM	1A	< 40%

M:F = 12:14

Média de idade = 65,54 ( $\pm$ 12,61) anos

US: ultrassonografia; F: feminino; M: masculino; Aa: arritmia cardíaca aguda; Ac: arritmia cardíaca crônica; FOP: forame oval patente; HAS: hipertensão arterial sistêmica; DM: diabetes mellitus; T: tabagismo; C: hipercolesterolemia; TG: hipertrigliceridemia; ICC: insuficiência cardíaca congestiva; O: obesidade; S: sedentarismo; AVC: acidente vascular cerebral prévio; AIT: ataque isquêmico transitório; IAM: infarto agudo do miocárdio prévio; H: hipertireoidismo controlado; IAP: insuficiência arterial periférica crônica; Toast = classificação do AVC isquêmico segundo Toast: 1A – possível AVC de grandes vasos (aterorombótico), 1B provável AVC de grandes vasos (aterotrombótico), 2 – doença de pequenos vasos (lacunar), 3 – cardioembólicos.

**TABELA 2 – descrição dos pacientes incluídos no grupo 2 (controles)**

No	sexo	Idade (anos)	fatores de risco
1	F	82	Ac, HAS, C
2	F	69	HAS, DM
3	F	74	Ac, T, C
4	F	64	C, HAS
5	F	87	HAS, DM, C
6	M	88	O, TG, C, HAS, DM
7	F	91	HAS, Ac, DM, ICC
8	M	89	ICC, HAS, DM
9	F	74	Ac, HAS, DM, ICC
10	F	77	DM, HAS
11	F	64	HAS, T
12	M	59	HAS, DM, O
13	M	43	T, HAS
14	F	67	T, C
15	F	86	ICC, HAS, S
16	F	84	HAS, DM
17	F	70	HAS, C
18	F	58	HAS, DM, C
19	F	64	HAS, C
20	M	74	S, T, C
21	F	66	HAS, TG, C
22	F	67	S, C
23	M	72	C, TG, DM
24	F	79	HAS, DM, O
25	F	72	HAS, DM, C, O.
26	F	68	HAS, S, TG
27	F	69	HAS, O, C, TG
28	M	77	HAS, C, TG
29	F	81	HAS, C
30	F	77	DM, HAS, C

M:F = 7:23

Média de idade = 73,06 ( $\pm$ 10,63) anos

F: feminino; M: masculino; Aa: arritmia cardíaca aguda; Ac: arritmia cardíaca crônica; FOP: forame oval patente; HAS: hipertensão arterial sistêmica; DM: diabetes mellitus; T: tabagismo; C: hipercolesterolemia; TG: hipertrigliceridemia; ICC: insuficiência cardíaca congestiva; O: obesidade; S: sedentarismo; AVC: acidente vascular cerebral prévio; AIT: ataque isquêmico transitório; IAM: infarto agudo do miocárdio prévio; H: hipertireoidismo controlado; IAP: insuficiência arterial periférica crônica.

**TABELA 3 – avaliação do grupo 2**

No	grau de estenose pelo US de carótidas	evolução em 18 meses ( $\pm$ 3)
1	estenose < 40%	AVC
2	estenose < 40%	AVC
3	não avaliado	Óbito (TEP)
4	sem estenose	Estável
5	estenose > 70%	Óbito (BCP + sepsis)
6	estenose < 40%	Óbito (IAM)
7	estenose < 69%	AVC / demência
8	estenose > 70%	Óbito (EAP)
9	estenose < 50%	Sem contato
10	estenose < 69%	Estável
11	estenose < 50%	AVC
12	sem estenose	IAM
13	sem estenose	Estável
14	sem estenose	Estável
15	estenose < 40%	IAM / ICC
16	estenose < 40%	Estável
17	sem estenose	Estável
18	sem estenose	Estável
19	sem estenose	Estável
20	sem estenose	Sem contato
21	sem estenose	Sem contato
22	sem estenose	Estável
23	sem estenose	Estável
24	estenose < 50%	Estável
25	estenose < 50%	Estável
26	sem estenose	Estável
27	sem estenose	Estável
28	sem estenose	Sem contato
29	estenose < 40%	Estável
30	estenose < 69%	AVC

US: ultrassonografia; Estável: estado clínico inalterado; TEP: tromboembolismo pulmonar; IAM: infarto agudo do miocárdio; AVC: acidente vascular cerebral; ICC: insuficiência cardíaca congestiva; EAP: edema agudo de pulmão; BCP: broncopneumonia.



**TABELA 4 - comparação entre 16 pacientes do grupo 1 e 29 pacientes do grupo 2 em relação à presença ou não de estenose carotídea.**

grupo	Estenose carotídea		Total
	presente	ausente	
1	14	2	16
	87,50	12,50	100,00
2	15	14	29
	51,72	48,28	100,00
Total	29	16	45
	64,44	35,56	100,00

$p = 0,016$  (estatisticamente significativa)

**TABELA 5 – valores das interleucinas no sobrenadante de cultura de células mononucleares obtidas nos pacientes dos grupos 1 e 2 (em pg/mL).**

No	Grupo 1				Grupo 2		
	IL-10	IL-1 $\beta$	IL-2	Tempo*	IL-10	IL-1 $\beta$	IL-2
1	2453,61	5132,00	1603,66	24	592,22	5535,05	1405,84
2	3151,14	3401,45	5963,35	16	443,54	5085,05	1399,70
3	2534,07	712,91	1384,88	16	324,18	5109,45	<7,80
4	1433,36	635,49	5059,56	25	3007,25	1041,85	216,67
5	457,10	1932,20	<7,80	16	1122,50	5369,00	503,71
6	165,75	3670,53	1144,92	13	1096,26	5535,05	540,68
7	632,28	4104,66	1378,75	22	1493,87	4068,02	1036,43
8	2395,56	1165,98	1762,76	24	477,37	4366,17	610,60
9	802,61	975,02	2086,29	24	3151,14	5535,05	1200,70
10	1045,50	1669,38	2237,23	24	3007,25	4132,28	2755,23
11	161,265	5535,05	<7,80	9	2975,83	5132,00	<7,80
12	1842,72	3288,61	615,81	17	920,24	3620,90	<7,80
13	1241,41	485,27	1710,48	20	3151,14	3768,80	1929,90
14	1585,91	1554,62	1157,21	48	3151,14	864,95	503,69
15	<7,80	<7,80	<7,80	7	2279,51	2746,64	46,27
16	2683,00	2185,00	4004,08	30	2343,96	1280,47	5963,35
17	3151,14	307,165	5963,35	22	2546,15	1512,96	2233,54
18	490,44	<7,80	1121,22	21	3007,25	1264,99	5963,35
19	3151,14	853,965	5963,35	48	1892,92	498,51	4525,93
20	2231,60	529,84	739,28	18	258,73	1381,08	5347,24
21	1286,65	2213,78	1245,90	21	2276,71	1158,57	3279,84
22	178,625	<7,80	78,86	39	1868,34	41,54	622,44
23	1778,73	1531,23	4434,39	24	1316,59	76,87	3563,91
24	3151,14	5535,05	2187,00	18	1125,20	245,18	5221,68
25	583,41	5535,05	5963,35	24	1430,20	199,27	2795,64
26	1162,46	1482,14	1984,20	24	588,96	814,18	<7,80
27	-	-	-	-	1018,51	<7,80	337,05
28	-	-	-	-	371,74	<7,80	<7,80
29	-	-	-	-	1018,51	4681,12	2051,47
30	-	-	-	-	371,74	4626,83	3411,61

grupo 1: pacientes com AVC isquêmico; grupo 2: controles; \* tempo: tempo decorrido entre a instalação do AVC e a coleta do sangue em horas.

**TABELA 6 – comparação entre os grupos 1 e 2 em relação aos valores de IL-1 $\beta$ , 2 e 10 na cultura de células mononucleares.**

Variável	GRUPO	<i>n</i>	Média	Desvio-padrão	Significância ( <i>p</i> )
IL_10	1	26	1528,57	1058,63	0,805*
	2	30	1620,96	1027,39	
IL_1b	1	26	2092,81	1841,67	0,479*
	2	30	2655,87	2116,65	
IL_2	1	26	2298,71	2030,26	0,370*
	2	30	1914,25	1939,93	

grupo 1: pacientes com AVC isquêmico; grupo 2: controles;

\* estatisticamente não significante.

**TABELA 7-A - gravidade do AVC isquêmico segundo a NIHSS aplicada na chegada dos pacientes do grupo 1 ao pronto-socorro.**

leve (NIHSS = 0-4)		moderado (NIHSS = 5-18)		grave (NIHSS > 18)	
No	NIH (1)	No	NIH (1)	No	NIH (1)
		1	14		
2	4				
		3	12		
4	2			5	19
		6	11		
				7	36
		8	6		
9	4				
10	3				
		11	6		
12	4				
13	4				
		14	6		
				15	36
		16	9		
		17	7		
		18	6		
		19	11		
20	3				
		21	7		
				22	19
		23	5		
		24	8		
25	2				
		26	9		

NIH (1): *score* obtido na chegada ao hospital.

**TABELA 7-B – evolução da NIHSS nas primeiras 72 horas da fase aguda do AVC isquêmico nos pacientes do grupo 1.**

piora (aumento)		estável		melhora (redução)	
No	NIH (2)	No	NIH (2)	No	NIH (2)
				1	10
		2	4		
		3	12		
		4	2		
		5	19		
6	15				
		7	36		
				8	1
9	6				
		10	3		
11	12				
		12	4		
		13	4		
14	36				
		15	36		
				16	3
		17	7		
		18	6		
				19	0
				20	1
				21	6
		22	19		
		23	5		
				24	6
25	4				
		26	9		

NIH (2): *score* obtido após 72 horas do AVC.

**TABELA 8 – correlação entre a gravidade do AVC segundo a NIHSS aplicada na chegada ao pronto-socorro e as dosagens de IL-1 $\beta$ , 2 e 10 no sobrenadante da culturas de células mononucleares dos pacientes incluídos no grupo 1.**

Variável	Estatística	NIH (1)
IL-10	Coef. Correl.	-0,141
	Significância ( <i>p</i> )	0,493*
	<i>n</i>	26
IL-1 $\beta$	Coef. Correl.	-0,021
	Significância ( <i>p</i> )	0,919*
	<i>n</i>	26
IL-2	Coef. Correl.	-0,384
	Significância ( <i>p</i> )	0,053*
	<i>n</i>	26

NIH (1): *score* obtido na chegada ao hospital;

\* estatisticamente não significante.

**TABELA 9 - correlação entre a evolução do déficit neurológico nas primeiras 72 horas do AVC segundo a NIHSS e as dosagens de IL-1 $\beta$ , 2 e 10 no sobrenadante da cultura de células mononucleares obtida na inclusão dos pacientes do grupo 1.**

	evolução em 72 hs	<i>n</i>	Média	Desvio-padrão	Significância ( <i>p</i> )
IL-10	Pior	5	659,79	586,63	0,040*
	Estável	21	1735,42	1048,05	
IL-1 $\beta$	Pior	5	3454,05	2148,34	0,073**
	Estável	21	1768,70	1656,22	
IL-2	Pior	5	2068,79	2300,25	0,648**
	Estável	21	2353,45	2019,37	

“pior”: NIH (1) < NIH (2); “estável”: NIH (1) > NIH (2) ou NIH (1) = NIH (2).

\* estatisticamente significante; \*\* estatisticamente não significante.

**TABELA 10 – análise da curva ROC: valor de IL-10 na inclusão dos pacientes do grupo 1, associado à melhor relação entre sensibilidade e especificidade, que pode ser utilizado como corte para classificar os indivíduos de acordo com a evolução da NIHSS nas primeiras 72 horas da fase aguda do AVC isquêmico.**

Valor de Corte <sup>+</sup>	Sensibilidade	1-Especificidade	Especificidade	Produto	Eficiência
-8,800	1,000	1,000	0,000	0,000	0,500
76,733	0,952	1,000	0,000	0,000	0,476
163,508	0,952	0,800	0,200	0,190	0,576
172,188	0,952	0,600	0,400	0,381	0,676
317,863	0,905	0,600	0,400	0,362	0,652
473,770	0,857	0,600	0,400	0,343	0,629
536,925	0,810	0,600	0,400	0,324	0,605
607,845	0,810	0,400	0,600	0,486	0,705
717,445	0,762	0,400	0,600	0,457	0,681
924,055	0,762	0,200	0,800	0,610	0,781
1103,978	0,714	0,200	0,800	0,571	0,757
1201,930	0,667	0,200	0,800	0,533	0,733
1264,025	0,619	0,200	0,800	0,495	0,710
1360,000	0,571	0,200	0,800	0,457	0,686
1509,630	0,524	0,200	0,800	0,419	0,662
1682,315	0,524	0,000	1,000	0,524	0,762
1810,723	0,476	0,000	1,000	0,476	0,738
2037,158	0,429	0,000	1,000	0,429	0,714
2313,578	0,381	0,000	1,000	0,381	0,690
2424,583	0,333	0,000	1,000	0,333	0,667
2493,838	0,286	0,000	1,000	0,286	0,643
2608,533	0,238	0,000	1,000	0,238	0,619
2917,065	0,190	0,000	1,000	0,190	0,595
3152,135	0,000	0,000	1,000	0,000	0,500

<sup>+</sup> em pg / mL

**TABELA 11 – avaliação do *score* da mRS após 72 horas, 6 e 18 meses após o AVC e o “parecer” dos pacientes do grupo 1 no 6º mês do AVC.**

No	mRS (1)	mRS (2) e “parecer do do paciente”	mRS (3)
<b>pacientes com “melhora” em seis meses</b>			
1	3	2 / Melhorou (NIHSS = 5)	2
4	1	1 / Melhorou	0
8	1	1 / Melhorou	0
9	2	2 / Melhorou	1
10	1	1 / Melhorou	1
13	1	1 / Melhorou	0
17	2	1 / Melhorou	1
18	2	2 / Melhorou	1
19	1	0 / Melhorou	0
20	1	1 / Melhorou	0
23	2	1 / Melhorou	1
26	3	2 / Melhorou	1
<b>pacientes com “piora” em seis meses</b>			
2	3	4 / Piorou (novo AVC)	4
3	4	4 / Piorou	2
5	5	6 / Piorou (óbito por BCP)	6
6	4	5 / Piorou (novo AVCI)	5
7	5	6 / Piorou (óbito pelo AVC)	6
11	3	6 / Piorou - óbito após 7 dias (novo AVC hemisférico)	6
12	1	2 / Piorou (demência)	3
14	5	6 / Piorou (óbito pelo AVC)	6
15	5	6 / Piorou (óbito pelo AVC)	6
16	2	5 / Piorou (novo AVCI)	4
21	2	2 / Piorou (demência)	2
22	5	6 / Piorou (óbito por BCP)	6
24	2	3 / Piorou (AVC após 4 meses)	3
25	2	3 / Piorou (novo AVC)	3

mRS (1): *score* obtido pela escala de Rankin modificada após 72 horas do AVC; mRS (2): *score* obtido pela escala de Rankin modificada após 6 meses do AVC via contato telefônico; mRS (3): *score* obtido pela escala de Rankin modificada após 18 meses do AVC via contato telefônico;

**TABELA 12 – correlação entre a evolução da mRS associada ao “parecer do paciente” no 6º mês do AVC isquêmico e as dosagens de IL-1 $\beta$ , 2 e 10 no sobrenadante da cultura de células mononucleares obtida nas primeiras horas da fase aguda nos pacientes do grupo 1.**

	Evolução em 6 meses	n	Média	Desvio-padrão	Significância (p)
IL_10	Pior	14	1220,86	1164,83	0,091**
	Melhor	12	1948,43	815,26	
IL_1b	Pior	14	2995,41	1910,47	0,014*
	Melhor	12	1290,03	1288,32	
IL_2	Pior	14	1824,29	2144,04	0,044*
	Melhor	12	2910,79	1884,82	

\* estatisticamente significante; \*\* estatisticamente não significante.

**TABELA 13 – análise da curva ROC: valor de IL-1 $\beta$  na inclusão dos pacientes do grupo 1, associado à melhor relação entre sensibilidade e especificidade, que pode ser utilizado como corte para identificar os indivíduos classificados como “pior” ou “melhor” no 6º mês do AVC isquêmico.**

Valor de Corte <sup>+</sup>	Sensibilidade	1-Especificidade	Especificidade	Produto	Eficiência
-8,800	1,000	1,000	0,000	0,000	0,500
149,683	0,846	1,000	0,000	0,000	0,423
396,218	0,846	0,917	0,083	0,071	0,465
507,555	0,846	0,833	0,167	0,141	0,506
582,665	0,846	0,750	0,250	0,212	0,548
674,200	0,846	0,667	0,333	0,282	0,590
783,438	0,846	0,583	0,417	0,353	0,631
914,493	0,846	0,500	0,500	0,423	0,673
1070,500	0,846	0,417	0,583	0,494	0,715
1324,058	0,846	0,333	0,667	0,564	0,756
1506,683	0,846	0,250	0,750	0,635	0,798
1542,923	0,846	0,167	0,833	0,705	0,840
1611,995	0,769	0,167	0,833	0,641	0,801
1800,788	0,769	0,083	0,917	0,705	0,843
2058,598	0,692	0,083	0,917	0,635	0,804
2199,388	0,615	0,083	0,917	0,564	0,766
2751,193	0,538	0,083	0,917	0,494	0,728
3345,025	0,462	0,083	0,917	0,423	0,689
3535,985	0,385	0,083	0,917	0,353	0,651
3887,593	0,308	0,083	0,917	0,282	0,612
4618,330	0,231	0,083	0,917	0,212	0,574
5333,525	0,231	0,000	1,000	0,231	0,615
5536,050	0,000	0,000	1,000	0,000	0,500

<sup>+</sup> em pg / mL

**TABELA 14 – análise da curva ROC: valor de IL-2 na inclusão dos pacientes do grupo 1, associado à melhor relação entre sensibilidade e especificidade, que pode ser utilizado como corte para identificar os indivíduos classificados como “piores” ou “melhores” no 6º mês do AVC isquêmico.**

Valor de Corte <sup>+</sup>	Sensibilidade	1-Especificidade	Especificidade	Produto	Eficiência
-8,800	1,000	1,000	0,000	0,000	0,500
35,530	1,000	0,769	0,231	0,231	0,615
347,335	1,000	0,692	0,308	0,308	0,654
677,545	1,000	0,615	0,385	0,385	0,692
942,100	0,917	0,615	0,385	0,353	0,651
1151,065	0,917	0,538	0,462	0,423	0,689
1201,555	0,917	0,462	0,538	0,494	0,728
1312,325	0,917	0,385	0,615	0,564	0,766
1381,815	0,917	0,308	0,692	0,635	0,804
1494,270	0,833	0,308	0,692	0,577	0,763
1657,070	0,750	0,308	0,692	0,519	0,721
1736,620	0,667	0,308	0,692	0,462	0,679
1873,481	0,583	0,308	0,692	0,404	0,638
2035,246	0,500	0,308	0,692	0,346	0,596
2136,645	0,417	0,308	0,692	0,288	0,554
2212,115	0,417	0,231	0,769	0,321	0,593
3120,655	0,333	0,231	0,769	0,256	0,551
4219,235	0,333	0,154	0,846	0,282	0,590
4746,975	0,250	0,154	0,846	0,212	0,548
5511,455	0,167	0,154	0,846	0,141	0,506
5964,350	0,000	0,000	1,000	0,000	0,500

<sup>+</sup> em pg / mL

**TABELA 15 – correlação entre o score da mRS no 18º mês do AVC isquêmico e as dosagens de IL-1 $\beta$ , 2 e 10 no sobrenadante da cultura de células mononucleares obtida nas primeiras horas da fase aguda.**

	Estatística	mRS após 18 meses
IL-10	Coef. Correl.	-0,422
	Significância (p)	0,032*
	<i>n</i>	26
IL-1b	Coef. Correl.	+0,418
	Significância (p)	0,033*
	<i>n</i>	26
IL-2	Coef. Correl.	-0,490
	Significância (p)	0,011*
	<i>n</i>	26

\* estatisticamente significativa.



**TABELA 4 - comparação entre 16 pacientes do grupo 1 e 29 pacientes do grupo 2 em relação à presença ou não de estenose carotídea.**

grupo	Estenose carotídea		Total
	presente	ausente	
1	14	2	16
	87,50	12,50	100,00
2	15	14	29
	51,72	48,28	100,00
Total	29	16	45
	64,44	35,56	100,00

$p = 0,016$  (estatisticamente significativa)

**TABELA 16 – correlação entre o desfecho após 18 meses de seguimento e os valores de IL-1 $\beta$ , IL-2 e IL-10 na inclusão dos pacientes do grupo 2 (controles), dosados em sobrenadante de cultura de células mononucleares.**

Variável	Evolução após 18 meses	<i>n</i>	Média	Desvio-padrão	Significância ( <i>p</i> )
IL_10	“não estáveis”	11	1099,75	854,79	0,009*
	“estáveis”	15	2031,56	910,22	
IL_1b	“não estáveis”	11	4654,01	884,18	< 0,001*
	“estáveis”	15	1361,01	1553,53	
IL_2	“não estáveis”	11	811,95	1015,78	0,025*
	“estáveis”	15	2578,40	2087,08	

“estáveis”: todos os indivíduos que não apresentaram os desfechos “óbito”, IAM ou AVC; “desfavoráveis”: indivíduos que evoluíram com AVC, IAM ou óbito de qualquer natureza no período. \* estatisticamente significativa.

**TABELA 17** – análise da curva ROC: valor de IL-10 na inclusão dos pacientes do grupo 2 (controles), associado à melhor relação entre sensibilidade e especificidade, que pode ser utilizado como corte para classificar os indivíduos de acordo com o desfecho após seguimento de 18 meses.

Valor de Corte <sup>+</sup>	Sensibilidade	1-Especificidade	Especificidade	Produto	Eficiência
323,175	1,000	1,000	0,000	0,000	0,500
347,955	1,000	0,909	0,091	0,091	0,545
407,635	1,000	0,818	0,182	0,182	0,591
460,453	1,000	0,727	0,273	0,273	0,636
533,165	1,000	0,636	0,364	0,364	0,682
590,590	0,933	0,636	0,364	0,339	0,648
756,228	0,933	0,545	0,455	0,424	0,694
969,373	0,933	0,455	0,545	0,509	0,739
1057,385	0,800	0,455	0,545	0,436	0,673
1109,380	0,800	0,364	0,636	0,509	0,718
1123,848	0,800	0,273	0,727	0,582	0,764
1220,890	0,733	0,273	0,727	0,533	0,730
1373,393	0,667	0,273	0,727	0,485	0,697
1462,033	0,600	0,273	0,727	0,436	0,664
1681,100	0,600	0,182	0,818	0,491	0,709
1880,628	0,533	0,182	0,818	0,436	0,676
2086,215	0,467	0,182	0,818	0,382	0,642
2311,735	0,467	0,091	0,909	0,424	0,688
2445,055	0,400	0,091	0,909	0,364	0,655
2760,990	0,333	0,091	0,909	0,303	0,621
2991,540	0,333	0,000	1,000	0,333	0,667
3079,193	0,133	0,000	1,000	0,133	0,567
3152,135	0,000	0,000	1,000	0,000	0,500

<sup>+</sup> em pg / mL

**TABELA 18** – análise da curva ROC: valor de IL-1 $\beta$  na inclusão dos pacientes do grupo 2 (controles), associado à melhor relação entre sensibilidade e especificidade, que pode ser utilizado como corte para classificar os indivíduos de acordo com o desfecho após seguimento de 18 meses.

Valor de Corte <sup>+</sup>	Sensibilidade	1-Especificidade	Especificidade	Produto	Eficiência
-8,800	1,000	1,000	0,000	0,000	0,500
16,868	1,000	0,933	0,067	0,067	0,533
59,203	1,000	0,867	0,133	0,133	0,567
138,068	1,000	0,800	0,200	0,200	0,600
222,220	1,000	0,733	0,267	0,267	0,633
371,843	1,000	0,667	0,333	0,333	0,667
656,343	1,000	0,600	0,400	0,400	0,700
839,563	1,000	0,533	0,467	0,467	0,733
953,398	1,000	0,467	0,533	0,533	0,767
1153,418	1,000	0,400	0,600	0,600	0,800
1272,730	1,000	0,333	0,667	0,667	0,833
1396,715	1,000	0,267	0,733	0,733	0,867
2129,798	1,000	0,200	0,800	0,800	0,900
3183,765	0,909	0,200	0,800	0,727	0,855
3694,845	0,818	0,200	0,800	0,655	0,809
3918,405	0,818	0,133	0,867	0,709	0,842
4100,148	0,727	0,133	0,867	0,630	0,797
4249,225	0,727	0,067	0,933	0,679	0,830
4496,500	0,636	0,067	0,933	0,594	0,785
4653,975	0,545	0,067	0,933	0,509	0,739
4883,085	0,545	0,000	1,000	0,545	0,773
5097,250	0,455	0,000	1,000	0,455	0,727
5120,725	0,364	0,000	1,000	0,364	0,682
5250,500	0,273	0,000	1,000	0,273	0,636
5452,025	0,182	0,000	1,000	0,182	0,591
5536,050	0,000	0,000	1,000	0,000	0,500

<sup>+</sup> em pg / mL

**TABELA 19** – análise da curva ROC: valor de IL-2 na inclusão dos pacientes do grupo 2 (controles), associado à melhor relação entre sensibilidade e especificidade, que pode ser utilizado como corte para classificar os indivíduos de acordo com o desfecho após seguimento de 18 meses.

Valor de Corte <sup>+</sup>	Sensibilidade	1-Especificidade	Especificidade	Produto	Eficiência
-8,800	1,000	1,000	0,000	0,000	0,500
19,235	0,933	0,727	0,273	0,255	0,603
131,470	0,933	0,636	0,364	0,339	0,648
276,860	0,867	0,636	0,364	0,315	0,615
420,370	0,800	0,636	0,364	0,291	0,582
503,700	0,733	0,636	0,364	0,267	0,548
522,195	0,733	0,545	0,455	0,333	0,594
575,640	0,733	0,455	0,545	0,400	0,639
616,520	0,733	0,364	0,636	0,467	0,685
829,435	0,667	0,364	0,636	0,424	0,652
1218,065	0,667	0,273	0,727	0,485	0,697
1402,770	0,667	0,182	0,818	0,545	0,742
1667,870	0,667	0,091	0,909	0,606	0,788
1990,685	0,600	0,091	0,909	0,545	0,755
2142,505	0,533	0,091	0,909	0,485	0,721
2494,385	0,467	0,091	0,909	0,424	0,688
2775,435	0,400	0,091	0,909	0,364	0,655
3103,625	0,333	0,091	0,909	0,303	0,621
3487,760	0,333	0,000	1,000	0,333	0,667
4044,920	0,267	0,000	1,000	0,267	0,633
4873,805	0,200	0,000	1,000	0,200	0,600
5592,515	0,133	0,000	1,000	0,133	0,567
5964,350	0,000	0,000	1,000	0,000	0,500

<sup>+</sup> em pg / mL

**TABELA 20** – correlação entre os níveis das interleucinas no início do seguimento e a presença de estenose (grupo 2).

Variável	estenose	n	Média	Desvio-padrão	Significância (p)
IL_10	+	15	1528,60	979,26	0,570*
	-	14	1812,55	1069,21	
IL_1b	+	15	3902,48	1885,73	0,001**
	-	14	1144,97	1204,25	
IL_2	+	15	1929,01	1805,52	0,760*
	-	14	2035,73	2141,06	

\* estatisticamente não significante; \*\* estatisticamente significante.

**TABELA 21** – análise da curva ROC: valor de IL-1 $\beta$  na inclusão dos pacientes do grupo 2 (controles), associado à melhor relação entre sensibilidade e especificidade, que pode ser utilizado como corte para classificar os indivíduos de acordo com o a presença ou ausência de estenose carotídea.

Valor de Corte <sup>+</sup>	Sensibilidade	1-Especificidade	Especificidade	Produto	Eficiência
-8,800	1,000	1,000	0,000	0,000	0,500
16,868	1,000	0,857	0,143	0,143	0,571
59,203	1,000	0,786	0,214	0,214	0,607
138,068	1,000	0,714	0,286	0,286	0,643
222,220	0,933	0,714	0,286	0,267	0,610
371,843	0,867	0,714	0,286	0,248	0,576
656,343	0,867	0,643	0,357	0,310	0,612
839,563	0,867	0,571	0,429	0,371	0,648
953,398	0,867	0,500	0,500	0,433	0,683
1100,208	0,867	0,429	0,571	0,495	0,719
1211,780	0,867	0,357	0,643	0,557	0,755
1272,730	0,867	0,286	0,714	0,619	0,790
1330,775	0,800	0,286	0,714	0,571	0,757
1447,020	0,800	0,214	0,786	0,629	0,793
2129,798	0,800	0,143	0,857	0,686	0,829
3183,765	0,733	0,143	0,857	0,629	0,795
3694,845	0,733	0,071	0,929	0,681	0,831
3918,405	0,733	0,000	1,000	0,733	0,867
4100,148	0,667	0,000	1,000	0,667	0,833
4249,225	0,600	0,000	1,000	0,600	0,800
4496,500	0,533	0,000	1,000	0,533	0,767
4653,975	0,467	0,000	1,000	0,467	0,733
4883,085	0,400	0,000	1,000	0,400	0,700
5108,525	0,333	0,000	1,000	0,333	0,667
5250,500	0,267	0,000	1,000	0,267	0,633
5452,025	0,200	0,000	1,000	0,200	0,600
5536,050	0,000	0,000	1,000	0,000	0,500

<sup>+</sup> em pg / mL

## 8. REFERÊNCIAS

1. Lessa I. Epidemiologia das doenças cerebrovasculares no Brasil. *Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo*. 1999;4:509-518.
2. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria Executiva. Datasus. Indicadores e Dados Básicos: Brasil - 2007. Available at: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/idb2007/matriz.htm>.
3. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Informações e Análises. Uma Análise da Mortalidade no Brasil 2000 - 2004. Available at: [http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=24421](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=24421).
4. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Análise de Situação em Saúde. Saúde Brasil 2006 : uma análise da situação de saúde no Brasil. In: Brasília: Ministério da Saúde; 2006:101, 147-163.
5. Menotti A, Jacobs DR, Blackburn H, et al. Twenty-five-year prediction of stroke deaths in the seven countries study: the role of blood pressure and its changes. *Stroke*. 1996;27(3):381-7.
6. Bonita R. Epidemiology of stroke. *Lancet*. 1992;339(8789):342-4.
7. Adams HP, Bendixen BH, Kappelle LJ, et al. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke*. 1993;24(1):35-41.
8. Napoli C, D'Armiento FP, Mancini FP, et al. Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. *J Clin Invest*. 1997;100(11):2680-90.
9. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature*. 2000;407(6801):233-41.
10. Mangge H, Hubmann H, Pilz S, et al. Beyond cholesterol--inflammatory cytokines, the key mediators in atherosclerosis. *Clin Chem Lab Med*. 2004;42(5):467-74.
11. Ross R. Atherosclerosis - an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999;340(2):115-26.

12. Bamford J, Sandercock P, Dennis M, Burn J, Warlow C. Classification and natural history of clinically identifiable subtypes of cerebral infarction. *Lancet*. 1991;337(8756):1521-6.
13. North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial Collaborators. Beneficial effect of carotid endarterectomy in symptomatic patients with high-grade carotid stenosis. *N Engl J Med*. 1991;325(7):445-53.
14. Binder CJ, Chang M, Shaw PX, et al. Innate and acquired immunity in atherogenesis. *Nat Med*. 2002;8(11):1218-26.
15. Mullenix PS, Andersen CA, Starnes BW. Atherosclerosis as inflammation. *Ann Vasc Surg*. 2005;19(1):130-8.
16. Steinberg D. Atherogenesis in perspective: hypercholesterolemia and inflammation as partners in crime. *Nat Med*. 2002;8(11):1211-7.
17. Muir KW, Tyrrell P, Sattar N, Warburton E. Inflammation and ischaemic stroke. *Curr Opin Neurol*. 2007;20(3):334-42.
18. Kleemann R, Zadelaar S, Kooistra T. Cytokines and atherosclerosis: a comprehensive review of studies in mice. *Cardiovasc Res*. 2008;79(3):360-76.
19. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002;420(6917):868-74.
20. Whiteley W, Tseng M, Sandercock P. Blood biomarkers in the diagnosis of ischemic stroke: a systematic review. *Stroke*. 2008;39(10):2902-9.
21. Dávalos A, Toni D, Iweins F, et al. Neurological deterioration in acute ischemic stroke: potential predictors and associated factors in the European cooperative acute stroke study (ECASS) I. *Stroke*. 1999;30(12):2631-6.
22. DeGraba TJ, Hallenbeck JM, Pettigrew KD, Dutka AJ, Kelly BJ. Progression in acute stroke: value of the initial NIH stroke scale score on patient stratification in future trials. *Stroke*. 1999;30(6):1208-12.
23. Gagliardi R, Silva E, Protti G, Ferezim P, Caiaffa-Filho H. Does a relationship exist between *Chlamydia pneumoniae* and stroke? . *Cerebrovasc Dis*. 2005;19(S2):158.

24. Gagliardi RJ, Silveira DR, Caffaro RA, Santos VPD, Caiaffa-Filho HH. Chlamydia pneumoniae and symptomatic carotid atherosclerotic plaque: a prospective study. *Arq Neuropsiquiatr*. 2007;65(2B):385-9.
25. Nakajima K, Nakano T, Tanaka A. The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis: the comparison of atherogenic effects on oxidized LDL and remnant lipoproteins in plasma. *Clin Chim Acta*. 2006;367(1-2):36-47.
26. Li D, Mehta JL. Antisense to LOX-1 inhibits oxidized LDL-mediated upregulation of monocyte chemoattractant protein-1 and monocyte adhesion to human coronary artery endothelial cells. *Circulation*. 2000;101(25):2889-95.
27. Cominacini L, Pasini AF, Garbin U, et al. Oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) binding to ox-LDL receptor-1 in endothelial cells induces the activation of NF-kappaB through an increased production of intracellular reactive oxygen species. *J Biol Chem*. 2000;275(17):12633-8.
28. Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med*. 1997;336(15):1066-71.
29. Blake GJ, Ridker PM. Novel clinical markers of vascular wall inflammation. *Circ Res*. 2001;89(9):763-71.
30. Han KH, Chang MK, Boullier A, et al. Oxidized LDL reduces monocyte CCR2 expression through pathways involving peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Clin Invest*. 2000;106(6):793-802.
31. Virella G, Lopes-Virella MF. Atherogenesis and the humoral immune response to modified lipoproteins. *Atherosclerosis*. 2008;200(2):239-46.
32. Hansson GK, Robertson AL, Söderberg-Nauclér C. Inflammation and atherosclerosis. *Annu Rev Pathol*. 2006;1:297-329.
33. Taleb S, Tedgui A, Mallat Z. Regulatory T-cell immunity and its relevance to atherosclerosis. *J Intern Med*. 2008;263(5):489-99.
34. Forte WCN. Órgãos linfóides e subpopulações de linfócitos. In: *Imunologia: do básico ao aplicado*. . 2nd ed. Porto Alegre: Artmed; 2007:64-70.
35. Forte WCN. Citocinas. In: Forte WCN, *Imunologia: do básico ao aplicado*. 2nd ed. Porto Alegre: Artmed; 2007:149-165.



36. Terr A. Inflammation. In: *Parslow TG, Stites DP, Terr AI, Imboden JB. Medical Immunology*. 10th ed. McGraw-Hill; 2001:189-203.
37. Caligiuri G, Nicoletti A, Poirier B, Hansson GK. Protective immunity against atherosclerosis carried by B cells of hypercholesterolemic mice. *J Clin Invest*. 2002;109(6):745-53.
38. Emsley HCA, Smith CJ, Gavin CM, et al. Clinical outcome following acute ischaemic stroke relates to both activation and autoregulatory inhibition of cytokine production. *BMC Neurol*. 2007;7:5.
39. Strle K, Zhou JH, Shen WH, et al. Interleukin-10 in the brain. *Crit Rev Immunol*. 2001;21(5):427-49.
40. Chen H, Li D, Saldeen T, Mehta JL. Transforming growth factor-beta(1) modulates oxidatively modified LDL-induced expression of adhesion molecules: role of LOX-1. *Circ Res*. 2001;89(12):1155-60.
41. Simi A, Tsakiri N, Wang P, Rothwell NJ. Interleukin-1 and inflammatory neurodegeneration. *Biochem Soc Trans*. 2007;35(Pt 5):1122-6.
42. Barone F, Tuma R, Legos J, Erhardt J, Parsons A. Brain Inflammation, Cytokines, and p38 MAP Kinase Signaling in Stroke. In: *Lin RCS. New concepts in cerebral ischemia*. CRC Press; 2002:210-253.
43. Stoll G, Jander S, Nadareishvili Z, Hallenbeck JM. Immunological aspects of ischemic stroke. In: *Antel J, Birnbaum G, Vicent A, Hartung H. Clinical Neuroimmunology*. 2nd ed.; 2005:403-412.
44. Wang Q, Tang XN, Yenari MA. The inflammatory response in stroke. *J Neuroimmunol*. 2007;184(1-2):53-68.
45. Feuerstein G, Wang X, Barone F. Inflammatory mediators and brain injury: the role of cytokines and chemokines in stroke and CNS diseases. In: *Ginsberg M, Bogousslavsky J. Cerebrovascular Disease: Pathophysiology, Diagnosis, and Management*. Boston, Mass: Blackwell Science; 1998:507-531.
46. Kochanek PM, Hallenbeck JM. Polymorphonuclear leukocytes and monocytes/macrophages in the pathogenesis of cerebral ischemia and stroke. *Stroke*. 1992;23(9):1367-79.

47. Stoll G, Jander S, Schroeter M. Inflammation and glial responses in ischemic brain lesions. *Prog Neurobiol.* 1998;56(2):149-71.
48. Huang J, Upadhyay UM, Tamargo RJ. Inflammation in stroke and focal cerebral ischemia. *Surg Neurol.* 2006;66(3):232-45.
49. Kleinschnitz C, Bendszus M, Frank M, et al. In vivo monitoring of macrophage infiltration in experimental ischemic brain lesions by magnetic resonance imaging. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2003;23(11):1356-61.
50. Saleh A, Schroeter M, Jonkmanns C, et al. In vivo MRI of brain inflammation in human ischaemic stroke. *Brain.* 2004;127(Pt 7):1670-7.
51. Hwang IK, Yoo K, Kim DW, et al. Transient ischemia-induced changes of interleukin-2 and its receptor beta immunoreactivity and levels in the gerbil hippocampal CA1 region. *Brain Res.* 2006;1106(1):197-204.
52. Wang X, Barone FC, Aiyar NV, Feuerstein GZ. Interleukin-1 receptor and receptor antagonist gene expression after focal stroke in rats. *Stroke.* 1997;28(1):155-61.
53. Haqqani AS, Nesic M, Preston E, et al. Characterization of vascular protein expression patterns in cerebral ischemia/reperfusion using laser capture microdissection and ICAT-nanoLC-MS/MS. *FASEB J.* 2005;19(13):1809-21.
54. Lazovic J, Basu A, Lin H, et al. Neuroinflammation and both cytotoxic and vasogenic edema are reduced in interleukin-1 type 1 receptor-deficient mice conferring neuroprotection. *Stroke.* 2005;36(10):2226-31.
55. Touzani O, Boutin H, LeFeuvre R, et al. Interleukin-1 influences ischemic brain damage in the mouse independently of the interleukin-1 type I receptor. *J Neurosci.* 2002;22(1):38-43.
56. Allan SM, Rothwell NJ. Cytokines and acute neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci.* 2001;2(10):734-44.
57. Tarkowski E, Rosengren L, Blomstrand C, et al. Intrathecal release of pro- and anti-inflammatory cytokines during stroke. *Clin Exp Immunol.* 1997;110(3):492-9.
58. Vila N, Castillo J, Dávalos A, et al. Levels of anti-inflammatory cytokines and neurological worsening in acute ischemic stroke. *Stroke.* 2003;34(3):671-5.

59. Silvestre JS, Mallat Z, Tamarat R, et al. Regulation of matrix metalloproteinase activity in ischemic tissue by interleukin-10: role in ischemia-induced angiogenesis. *Circ Res*. 2001;89(3):259-64.
60. Goldstein LB, Adams R, Alberts MJ, et al. Primary prevention of ischemic stroke: a guideline from the American Heart Association/American Stroke Association Stroke Council: cosponsored by the Atherosclerotic Peripheral Vascular Disease Interdisciplinary Working Group; Cardiovascular Nursing Council; Clinical Cardiology Council; Nutrition, Physical Activity, and Metabolism Council; and the Quality of Care and Outcomes Research Interdisciplinary Working Group. *Circulation*. 2006;113(24):e873-923.
61. Brott T, Marler JR, Olinger CP, et al. Measurements of acute cerebral infarction: lesion size by computed tomography. *Stroke*. 1989;20(7):871-5.
62. Goldstein LB, Samsa GP. Reliability of the National Institutes of Health Stroke Scale. Extension to non-neurologists in the context of a clinical trial. *Stroke*. 1997;28(2):307-10.
63. Tong DC, Yenari MA, Albers GW, et al. Correlation of perfusion- and diffusion-weighted MRI with NIHSS score in acute (<6.5 hour) ischemic stroke. *Neurology*. 1998;50(4):864-70.
64. Appelros P, Terént A. Characteristics of the National Institute of Health Stroke Scale: results from a population-based stroke cohort at baseline and after one year. *Cerebrovasc Dis*. 2004;17(1):21-7.
65. Bonita R, Beaglehole R. Modification of Rankin Scale: recovery of motor function after stroke. *Stroke*. 1988;19(12):1497-1500.
66. Emsley HCA, Hopkins SJ. Acute ischaemic stroke and infection: recent and emerging concepts. *Lancet Neurol*. 2008;7(4):341-53.
67. Emsley HCA, Smith CJ, Gavin CM, et al. An early and sustained peripheral inflammatory response in acute ischaemic stroke: relationships with infection and atherosclerosis. *J Neuroimmunol*. 2003;139(1-2):93-101.
68. Walker D, Jason J, Wallace K, et al. Spontaneous cytokine production and its effect on induced production. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2002;9(5):1049-56.
69. Hoshi T, Kitagawa K, Yamagami H, et al. Relations of serum high-sensitivity C-reactive protein and interleukin-6 levels with silent brain infarction. *Stroke*. 2005;36(4):768-72.

70. Basic Kes V, Simundic A, 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;41(13). Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TDD-4TC924J-3/2/93edaddafbd75373e1b2c7b2fed0f674> [Accessed October 20, 2008].
71. Spera PA, Ellison JA, Feuerstein GZ, Barone FC. IL-10 reduces rat brain injury following focal stroke. *Neurosci Lett*. 1998;251(3):189-92.
72. Grilli M, Barbieri I, Basudev H, et al. Interleukin-10 modulates neuronal threshold of vulnerability to ischaemic damage. *Eur J Neurosci*. 2000;12(7):2265-72.
73. Frenkel D, Huang Z, Maron R, et al. Neuroprotection by IL-10-producing MOG CD4+ T cells following ischemic stroke. *J Neurol Sci*. 2005;233(1-2):125-32.
74. Ooboshi H, Ibayashi S, Shichita T, et al. Postischemic gene transfer of interleukin-10 protects against both focal and global brain ischemia. *Circulation*. 2005;111(7):913-9.
75. Rallidis LS, Vikelis M, Panagiotakos DB, et al. Inflammatory markers and in-hospital mortality in acute ischaemic stroke. *Atherosclerosis*. 2006;189(1):193-7.
76. Castellanos M, Castillo J, García MM, et al. Inflammation-mediated damage in progressing lacunar infarctions: a potential therapeutic target. *Stroke*. 2002;33(4):982-7.
77. van Exel E, Gussekloo J, de Craen AJM, et al. Inflammation and stroke: the Leiden 85-Plus Study. *Stroke*. 2002;33(4):1135-8.
78. Sotgiu S, Zanda B, Marchetti B, et al. Inflammatory biomarkers in blood of patients with acute brain ischemia. *Eur J Neurol*. 2006;13(5):505-13.
79. Boutin H, LeFeuvre RA, Horai R, et al. Role of IL-1alpha and IL-1beta in ischemic brain damage. *J Neurosci*. 2001;21(15):5528-34.
80. Basu A, Krady JK, O'Malley M, et al. The type 1 interleukin-1 receptor is essential for the efficient activation of microglia and the induction of multiple proinflammatory mediators in response to brain injury. *J Neurosci*. 2002;22(14):6071-82.
81. Yamasaki Y, Matsuura N, Shozuhara H, et al. Interleukin-1 as a pathogenetic mediator of ischemic brain damage in rats. *Stroke*. 1995;26(4):676-80; discussion 681.

82. Denicoff KD, Rubinow DR, Papa MZ, et al. The neuropsychiatric effects of treatment with interleukin-2 and lymphokine-activated killer cells. *Ann Intern Med.* 1987;107(3):293-300.
83. Elkind MSV, Rundek T, Sciacca RR, et al. Interleukin-2 levels are associated with carotid artery intima-media thickness. *Atherosclerosis.* 2005;180(1):181-7.
84. Mizia-Stec K, Gasior Z, Zahorska-Markiewicz B, et al. Serum tumour necrosis factor-alpha, interleukin-2 and interleukin-10 activation in stable angina and acute coronary syndromes. *Coron Artery Dis.* 2003;14(6):431-8.
85. Upadhyya S, Mooteri S, Peckham N, Pai RG. Atherogenic effect of interleukin-2 and antiatherogenic effect of interleukin-2 antibody in apo-E-deficient mice. *Angiology.* 55(3):289-94.

## **FONTES CONSULTADAS**

Faculdades de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo. Pós-Graduação. Normalização para apresentação de dissertações e teses. São Paulo: Faculdades de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo. Pós-Graduação; 2004. 26p.

## RESUMO

### **Avaliação das interleucinas 1 $\beta$ , 2 e 10 como biomarcadores da fase aguda do acidente vascular cerebral isquêmico. Gustavo Guimarães Protti. Tese de mestrado – 2010**

Aterosclerose é atualmente definida como “doença inflamatória”, da qual o AVC representa uma das mais comuns e devastadoras manifestações. A isquemia, por sua vez, deflagra a cascata inflamatória com ativação de mediadores associados à deterioração neurológica. A presença de mediadores com ação antiinflamatória exerce, por outro lado, efeito potencialmente protetor. OBJETIVO: 1) correlacionar a gravidade do quadro de entrada do AVC com as concentrações séricas de IL-1 $\beta$ , IL-2 e IL-10; 2) correlacionar o prognóstico do AVC com os valores das dosagens destas interleucinas. CASUÍSTICA E MÉTODOS: foram dosadas as concentrações séricas das interleucinas 1 $\beta$ , 2 e 10 em 26 pacientes internados na Santa Casa de São Paulo durante o período de junho de 2005 a dezembro de 2006, com diagnóstico de AVC isquêmico. Os pacientes foram avaliados pela NIHSS nas primeiras 72 horas do AVC e em seis e 18 meses pela escala de mRS. O grupo controle foi composto por 30 indivíduos portadores de pelo menos dois fatores de risco para aterosclerose e sem doença cérebro-vascular conhecida. O grau de aterosclerose carotídea foi avaliado em todos os indivíduos incluídos por ultrassonografia com Doppler. RESULTADOS: Os pacientes com IL-10 < 925,0 pg/mL evoluem com deterioração neurológica nas primeiras 72 horas do AVC; IL-1 $\beta$  > 1800,788 e IL-2 > 1381,815 pg/mL estão associadas a piora da incapacidade funcional em seis meses; níveis elevados de IL-10 e IL-2 correlacionam-se inversamente ao *score* da mRS após 18 meses de AVC; finalmente, indivíduos do grupo controle com IL-1 $\beta$  < 3.919,0 pg/mL não apresentaram estenose carotídea de qualquer grau. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO: estes dados indicam que a IL-10 exerce efeito possivelmente protetor na fase aguda e em 18 meses; IL-1 $\beta$  é potencialmente deletéria em seis e 18 meses, além de possivelmente contribuir para a formação da placa de ateroma; finalmente, os dados sobre a IL-2 indicam que pode haver efeito benéfico desta interleucina sobre o prognóstico do AVC após seis e 18 meses.

## ABSTRACT

### **Evaluation of interleukines 1 $\beta$ , 2 e 10 as biomarkers of the acute phase of ischemic stroke. Gustavo Guimarães Protti. Thesis. 2010**

Over the recent years, atherosclerosis has been considered as an inflammatory disease and ischemic stroke is one of its most common and devastating manifestation. Evidences suggest that proinflammatory cytokines play a key role in the progression of the irreversible ischemic lesion. On the other hand, the presence of anti-inflammatory mediators may act inhibiting cytokine production, thus preventing secondary ischemic injury. PURPOSE: 1) asses the relationship between stroke severity and IL-1 $\beta$ , IL-2 and IL-10 levels; 2) asses the relationship between stroke prognosis over 18 months and the serum levels of these interleukins. METHODS: we measured the serum levels of IL-1 $\beta$ , IL-2 and IL-10 of 26 patients admitted in Santa Casa of São Paulo with acute stroke from June 2005 to December 2006. Neurological impairment was scored by the NIHSS within the first 72 hours after stroke onset and by mRS at 6 and 18 months follow-up. We also analyzed 30 control subjects with at least two risk factor for atherosclerosis. The degree of carotid atherosclerosis was assessed by duplex-ultrasound in all subjects. RESULTS: patients with IL-10 < 925,0 pg/mL presented neurological deterioration within the first 72 hours; IL-1 $\beta$  > 1800,788 and IL-2 > 1381,815 pg/mL were associated with functional disability worsening at the 6th month follow-up; high IL-10 and IL-2 levels were inversely correlated with mRS at the 18th month after stroke; finally, control subjects with IL-1 $\beta$  < 3.919,0 pg/mL did not present any degree of carotid stenosis. CONCLUSION: these data suggest that IL-10 may have protective effects against progressing ischemic injury during the acute phase and at the 18th month follow-up; IL-1 $\beta$  probably produce harmful effects by the 6th and 18th months; also, IL-1 $\beta$  may contribute for plaque progression. The role of IL-2 is uncertain; it seems to be protective by the 6<sup>th</sup> and 18<sup>th</sup> months after stroke.



## LISTAS E APÊNDICES

### *National Institute of Health Stroke Scale (NIHSS)*

Parâmetro	Pontuação
<b>1a.</b> Nível de consciência	0=alerta; 1=desperta com estímulo verbal; 2=desperta somente com estímulo doloroso; 3=resposta reflexa a estímulo álgico.
<b>1b.</b> Orientação: idade e mês	0=ambos corretos; 1=um correto; 2=ambos incorretos
<b>1c.</b> Comandos: abrir/fechar olhos, apertar e soltar mão	0=ambos corretos; 1=um correto; 2=ambos incorretos.
<b>2.</b> Motricidade ocular (voluntária ou olhos de boneca)	0=normal; 1=paresia do olhar conjugado; 2=desvio conjugado do olhar.
<b>3.</b> Campos visuais	0=normal; 1=hemianopsia parcial, quadrantanopsia, extinção; 2=hemianopsia completa; 3=cegueira cortical.
<b>4.</b> Paresia facial	0=normal; 1=paresia mínima (aspecto normal em repouso, sorriso assimétrico); 2=paresia/segmento inferior da face; 3=paresia/segmentos superior e inferior da face.
<b>5.</b> Motor membro superior: braços entendidos 90° (sentado) ou 45° (deitado) por 10 seg. <b>6.</b> Motor membro inferior: elevar perna a 30° deitado por 5seg MSD _____ MSE _____ MID _____ MIE _____	0=sem queda; 1=queda, mas não atinge o leito; 2=força contra gravidade, mas não sustenta; 3=sem força contra gravidade, mas qualquer movimento mínimo conta; 4=sem movimento.
<b>7.</b> Ataxia apendicular	0=sem ataxia (ou afásico, hemiplégico); 1=ataxia em membro superior ou inferior; 2=ataxia em membro superior e inferior.
<b>8.</b> Sensibilidade dolorosa	0=normal; 1=déficit unilateral, mas reconhece o estímulo (ou afásico, confuso); 2=paciente não reconhece o estímulo ou coma ou déficit bilateral.
<b>9.</b> Linguagem	0=normal; 1=afasia leve-moderada (compreensível); 2=afasia severa (quase sem troca de informações); 3=mudo, afasia global, coma.
<b>10.</b> Disartria	0=normal; 1=leve a moderada; 2=severa, ininteligível ou mudo; 3=intubado.
<b>11.</b> Extinção/negligência	0=normal; 1=negligência ou extinção em uma modalidade sensorial; 2=negligência em mais de uma modalidade sensorial.

***Modified Rankin Scale (mRS)***

0. Assintomático.
1. Sintomas sem incapacidade. Capaz de realizar suas tarefas e atividades habituais prévias.
2. Incapacidade leve. Incapaz de realizar todas suas atividades habituais prévias, mas capaz de realizar suas necessidades pessoais sem ajuda.
3. Incapacidade moderada. Requer alguma ajuda para as suas atividades, mas é capaz de andar sem ajuda de outra pessoa.
4. Incapacidade moderada a grave. Incapacidade de andar sem ajuda, incapacidade de realizar suas atividades sem ajuda.
5. Incapacidade grave. Limitado a cama, incontinência, requer cuidados de enfermeiros e atenção constante.
6. Óbito.

## Classificação do AVC isquêmico – TOAST

### 1. Aterosclerose de grandes artérias

- Evidência clínica de envolvimento cortical (afasias, negligência) ou tronco cerebral e cerebelo
- AIT no mesmo território, sopro cervical
- Tomografia ou ressonância com infarto hemisférico > 15 mm, lesões cerebelares ou corticais
- Angiografia convencional ou por ressonância ou Doppler cervical ou transcraniano sugestivo de estenose > 50% no território envolvido.

### 2. Doença de pequenas artérias (lacuna)

- Evidência clínica de síndrome lacunar
- História de hipertensão arterial sistêmica e diabetes
- Ausência de envolvimento cortical
- Tomografia ou ressonância normais ou com infarto < 15 mm (mais comumente no território dominante das pequenas artérias perforantes)

### 3. Cardioembólico

- *Fonte de alto risco:* prótese valvar metálica, fibrilacao atrial com ou sem estenose mitral, Trombo atrial ou ventricular, síndrome do nó sinusal, infarto do miocárdio com menos de 4 semanas, miocardiopatia dilatada, parede acinética de ventrículo esquerdo, mixoma atrial e endocardite bacteriana.
- *Fonte de médio risco:* prolapso de válvula mitral, calcificação ou estenose mitral, turbulência atrial (smoke), aneurisma atrial septal, forame oval patente, parede hipocinetica de ventrículo esquerdo, infarto do miocárdio entre 4 semanas e 6 meses.

### 4. Outras causas

- Vasculopatias não ateroscleróticas como dissecação de vasos cervicais;
- Trombofilias

### 5. Indeterminado

- Não cumpre os critérios anteriores após exaustiva investigação

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Resolução Conselho Nacional de Saúde 196/96, de 10 de outubro de 1996

### "Avaliação das interleucinas 1 $\beta$ , 2 e 10 como biomarcadores da fase aguda do acidente vascular cerebral isquêmico"

Esta pesquisa visa comparar os níveis de citocinas sanguíneas com a evolução clínica do acidente vascular cerebral ("derrame"). Citocinas são substâncias inflamatórias. A possibilidade de se estabelecer um marcador que preveja a evolução do caso é de grande interesse clínico.

O procedimento consiste apenas em coleta de uma amostra de sangue venoso periférico que será analisada por técnicas específicas no laboratório de imunologia. Está é a única participação do paciente na pesquisa. Portanto a pesquisa não oferece riscos ao paciente.

Será garantido ao participante: (1) disponibilidade ao tratamento clínico e assistência preconizados para os casos de acidente vascular cerebral, conforme habitualmente orientado a todos os pacientes portadores desta doença; (2) acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas; (3) liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência; (4) salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.

Caso a hipótese de que as citocinas sejam de fato bio-marcadores para o acidente vascular cerebral, isso permitirá melhor abordagem dos pacientes do grupo de alto risco com medidas de tratamento preventivo intensivo.

Após ter sido convenientemente esclarecido pelo pesquisador **Dr Gustavo Guimarães Protti** e ter entendido o que me foi explicado, eu, .....,  
 , consinto em participar como voluntário da pesquisa "**Avaliação das interleucinas 1 $\beta$ , 2 e 10 (marcadores inflamatórios) no prognóstico do acidente vascular cerebral**", realizada sob orientação do Prof. Dr. Rubens José Gagliardi. Ficou claro também que não terei despesas ou benefícios.

São Paulo, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

---

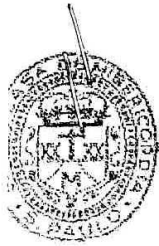
Assinatura do paciente participante da pesquisa ou seu responsável legal

---

Assinatura do pesquisador **Dr Gustavo Guimarães Protti**

Disciplina de Neurologia – tel (11) 3224-0122 – r. 5903

**Documento de aprovação do CEP**



**IRMANDADE DA SANTA CASA DE MISERICÓRDIA DE SÃO PAULO**  
**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS**  
 Rua Dr. Cesário Mota Júnior, 112 Santa Cecília CEP 01277900 São Paulo –SP  
 PABX (11) 32240122 Ramais: 5502/5710 – Fax- 3226.7041 E-mail: [eticamed@santacasasp.org.br](mailto:eticamed@santacasasp.org.br)

São Paulo, 02 de maio de 2005.

Projeto nº064/05  
 Informe este número para identificar  
 seu projeto no CEP

Ilmo.(a). Sr.(a).

**Dr.(a). Gustavo Guimarães Protti**

Departamento de Medicina

O Comitê de Ética em Pesquisa da ISCMSP, reunido no dia **30/03/05** e no cumprimento de suas atribuições, após revisão do seu projeto de pesquisa:  
 “**Avaliação das interleucinas 1-beta, 2 e 10 (marcadores inflamatórios) no prognóstico do acidente vascular cerebral**”,  
 emitiu parecer inicial em pendência e nesta data enquadrando-o na seguinte categoria:

- Aprovado inclusive o TCLE;**  
 **Com pendência** modificações ou informação relevante a serem atendidas em 60 dias (enviar as alterações em duas cópias)  
 **Retirado**, por não ser reapresentado no prazo determinado;  
 **Não aprovado:** e

**Aprovado inclusive TCLE** (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido versão), e encaminhado para apreciação da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – MS -CONEP, a qual deverá emitir parecer no prazo de 60 dias. **Informamos, outrossim, que, segundo os termos da Resolução 196/96 do Ministério da Saúde a pesquisa só poderá ser iniciada após o recebimento do parecer de aprovação da CONEP.**

  
 \_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Daniel R. Muñoz**

Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa –ISCMSP

## Kits OptEIA<sup>®</sup> (BD Biosciences<sup>®</sup>) para ensaio quantitativo (ELISA)

### Conteúdo:

- placas de 96 poços pré-sensibilizados com 2 µg/mL de anticorpo primário monoclonal anti-citocina
- *Elisa Diluent*<sup>1</sup>
- *Working Detection*<sup>3</sup>
- *Stop Solution*<sup>5</sup>

### Instruções do fabricante:

1. adicionar *Elisa Diluent*<sup>1</sup> 50 µL/poço
2. adicionar amostra com sobrenadantes de cultura 100 µL/poço, diluída 1:10 em PBS\*/BSA\*\* 2%
3. realizar paralelamente a curva padrão<sup>2</sup> com diluições seriadas das respectivas citocinas recombinantes
4. incubar as amostra com sobrenadantes de cultura e a curva padrão por 2h em temperatura ambiente
5. lavar as placas 5x com PBS\*/Tween
6. adicionar 100 µL/poço de *Working Detection*<sup>3</sup>
7. incubar as placas por 1h em temperatura ambiente e lavar 7x com PBS\*/Tween
8. adicionar TMB<sup>4</sup> 100 µL/poço e incubar por 30 min em temperatura ambiente
9. adicionar *Stop Solution*<sup>5</sup> 50 µL/poço para subsequente leitura da absorbância em 450 nm

### Observações:

- a) limites de detecção do ensaio: 7,8 – 500 pg/mL
- b) testar os exames em duplicata

<sup>1</sup> *Elisa Diluent*: PBS\*/BSA\*\* 2%; <sup>2</sup> *padrão*: seis diluições seriadas a partir de 500 pg/ML; <sup>3</sup> *Working Detection*: anticorpo monoclonal biotilado anti-citocina + conjugado de Avidina-peroxidase; <sup>4</sup> *TMB*: 3,3', 5,5' tetrametilbenzidina (substrato indutor da peroxidase); <sup>5</sup> *Stop Solution*: ácido fosfórico 1M; \* *PBS*: phosphate buffered saline; \*\* *BSA*: soro-albumina bovino.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)