



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LUANA APARECIDA COSSENTINI

**NÍVEIS SÉRICOS DE HOMOCISTEÍNA E SUA RELAÇÃO
COM O ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES COM
ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO**

Londrina
2019

LUANA APARECIDA COSSENTINI

**NÍVEIS SÉRICOS DE HOMOCISTEÍNA E SUA RELAÇÃO
COM O ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES COM
ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina como requisito para obtenção do título de Doutora.

Orientador: Prof. Dr. Isaias Dichi.

Londrina
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

C836 Cossentini, Luana Aparecida .
NÍVEIS SÉRICOS DE HOMOCISTEÍNA E SUA RELAÇÃO COM O ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES COM ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO / Luana Aparecida Cossentini. - Londrina, 2019.
71 f.

Orientador: Andreia Name Colado Simão.
Coorientador: Isaias Dichi.
Tese (Doutorado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2019.
Inclui bibliografia.

1. Acidente Vascular Encefálico - Tese. 2. Homocisteína - Tese. 3. Estresse Oxidativo - Tese. I. Simão, Andreia Name Colado . II. Dichi, Isaias. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. IV. Título.

CDU 616

LUANA APARECIDA COSSENTINI

**NÍVEIS SÉRICOS DE HOMOCISTEÍNA E SUA RELAÇÃO COM O
ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES COM ACIDENTE
VASCULAR ENCEFÁLICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina como requisito para obtenção do título de Doutora.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. José Wander Bregano
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Marcell Alysson Batisti Lozovoy
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dra. Naiara Lourenço Mari
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dra. Neide Tomimura Costa
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 26 de março de 2019.

Dedico este trabalho aos meus pais
Aparecida Oliveira Santos Cossentini e
Osmar Cossentini

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente a Deus e a Nossa Senhora Aparecida e São Jorge que sempre me ajudaram, e com fé me fizeram chegar até aqui.

Agradeço aos meus pais Osmar Cossentini e Aparecida Oliveira Santos Cossentini por estarem sempre ao meu lado, mesmo não entendendo mas sempre acreditando nos meus sonhos.

Agradecimento especial para o professor Dr. Isaias Dichi, por toda a ajuda, motivação e paciência para comigo e esse trabalho.

Agradecimento a professora Dra. Andrea Name Colado Simão, por toda compreensão, ajuda e ensinamento durante os anos de laboratório.

A todos os (as) colegas de laboratório que sempre me ajudaram, meu apreço.

Aos colegas dos laboratórios vizinhos e do departamento por serem sempre prestativos.

Aos amigos para toda vida Vanessa Almeida Nascimento, Janeth Escobar Arcos (Colômbia), Renata Streck, Fernando Cezar, Paulo Henrique da Silva, Willian Queiroz, Jean Silva de Lima, Arnold Marques, Luan Guilherme e Rafael Silveira (*in memoriam*). Obrigada!

Agradecimento especial a todas as pessoas que me fizeram mais humana e engajada em movimentos sociais. Resgatando o conceito de humanidade e solidariedade que por vezes não vemos ao redor.

Gênio?

Neste momento

Cem mil cérebros se concebem em

Sonhos gênios como eu,

E a história não marcará,

Quem sabe, nem um.

Tabacaria - Fernando Pessoa
(Álvaro de Campos) – 15/01/1928

COSENTINI, Luana Aparecida. **Níveis séricos de homocisteína e sua relação com o estresse oxidativo em pacientes com acidente vascular encefálico.** 2019. 83p. Tese de Doutorado (Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

RESUMO

O acidente vascular encefálico (AVE) é uma das principais causas de morbimortalidade em muitos países devido à suas sequelas apresenta importantes implicações socioeconômicas. O AVE possui duas formas principais de apresentação: o AVE isquêmico, o mais frequente, e o AVE hemorrágico, o mais grave. No momento desses eventos o suprimento de oxigênio e nutrientes diminui ou cessa por completo, causando danos ao tecido cerebral caracterizado por morte celular rápida na microrregião. A reperfusão, onde ocorre a retomada do fluxo sanguíneo, pode sobrecarregar a respiração mitocondrial, levando a um pico na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) pelas mitocôndrias causando cada vez mais danos. Estudo prévio com pacientes com AVE isquêmico verificou a existência de valores de homocisteína plasmáticos mais altos do que o relatado no grupo controle, o que sugere a associação entre níveis de homocisteína plasmáticos e a ocorrência de AVE. A homocisteína é um produto intermediário na biossíntese normal dos aminoácidos metionina e cisteína. Está bem estabelecido que a homocisteína plasmática elevada seja um fator de risco vascular. **Objetivo:** Verificar os níveis de homocisteína sérica e do estresse oxidativo em pacientes acometidos com AVE, atendidos no Hospital Universitário de Londrina – PR e desenvolver uma revisão bibliográfica a cerca do assunto. **Materiais e Métodos:** 170 pacientes com AVE e 220 controles saudáveis da mesma área geográfica foram recrutados no Hospital Universitário de Londrina da Universidade Estadual de Londrina. Inicialmente, foram comparados os níveis de homocisteína dos pacientes com AVE e dos controles. A seguir, os pacientes com AVE foram divididos em dois grupos de 85 pacientes sem hiperhomocisteinemia ($<13,59\mu\text{mol/L}$) e com ($\geq 13,59\mu\text{mol/L}$) hiperhomocisteinemia. Os dados demográficos e os biomarcadores inflamatórios foram analisados nos dois grupos de pacientes com AVE sem e com hiperhomocisteinemia. Os pacientes foram classificados segundo a escala de Rankin, a qual determina o estado físico do paciente. Para a revisão foram selecionados artigos de 1996 a 2019, disponíveis na base de dados Pubmed e LILACS, optou-se pela busca por termos livres, sem o uso de vocabulário controlado (descritores). **Resultados:** Os pacientes com AVE apresentaram altos níveis de homocisteinemia quando comparados com o grupo controle ($p < 0,001$) ajustado para as variáveis sexo, etnia e idade. Em análise posterior, quando os grupos foram divididos de acordo com os níveis de homocisteína, houve diferenças significativas em relação ao sexo ($p < 0,001$), escala modificada de Rankin no início do estudo ($p < 0,034$) e glicose ($p < 0,020$). Em análise dos marcadores de estresse oxidativo verificou-se tendência à diminuição nos níveis de NOx ($p < 0,071$) e um significativo aumento no TRAP ($p < 0,003$) no grupo de pacientes com hiperhomocisteinemia. Após a realização das análises de regressão logística binomial verificou-se que glicose ($0,017$) e TRAP ($p < 0,019$) foram independentemente associados à hiperhomocisteinemia em pacientes com AVE. **Conclusão:** Pacientes com AVE apresentam altas taxas de homocisteína sérica. TRAP e glicemia estão associados à

hiper-homocisteinemia. Com o artigo de revisão concluímos que existe uma grande quantidade de referências sobre o estudo do AVE, entretanto são escassos quando o assunto é a relação entre AVE, estresse oxidativo e homocisteína, tornando de grande importância a pesquisa e publicações que ampliem essa discussão.

Palavras chave: Acidente Vascular Encefálico, Homocisteína, Estresse Oxidativo.

COSENTINI, Luana Aparecida. **Serum levels of homocysteine and its relation 1 with oxidative stress in patients with stroke.** 2019. 83 p. Doctoral Thesis 2 (Graduate Program in Experimental Pathology) - State University of Londrina, 3 Londrina, 2019.

ABSTRACT

Stroke is one of the main causes of morbidity and mortality in many countries and due to its sequelae has important socioeconomic implications. The AVE has two main forms of presentation: the ischemic stroke, the most frequent, and the hemorrhagic stroke, the most severe. At the time of these events the supply of oxygen and nutrients decreases or ceases altogether, causing damage to brain tissue characterized by rapid cell death in the microregion. Reperfusion, where the resumption of blood flow occurs, can overwhelm mitochondrial respiration, leading to a peak in the production of reactive oxygen species (ROS) by mitochondria causing more and more damage. A previous study with patients with ischemic stroke found higher plasma homocysteine values than those reported in the control group, suggesting the association between plasma homocysteine levels and the occurrence of stroke. Homocysteine is an intermediate product in the normal biosynthesis of the amino acids methionine and cysteine. It is well established that high plasma homocysteine is a vascular risk factor. **Objective:** To verify the levels of serum homocysteine and oxidative stress in stroke patients attended at the University Hospital of Londrina - PR and develop a bibliographic review about the subject. **Materials and Methods:** 170 patients with stroke and 220 healthy controls from the same geographical area were recruited at the University Hospital of Londrina, State University of Londrina. Initially, the homocysteine levels of stroke patients and controls were compared. Afterwards, patients with stroke were divided into two groups of 85 patients without hyperhomocysteinemia ($<13.59 \mu\text{mol/L}$) and hyperhomocysteinemia ($\geq 13.59 \mu\text{mol/L}$). Demographic data and inflammatory biomarkers were analyzed in both groups of stroke patients with and without hyperhomocysteinemia. Patients were classified according to the Rankin scale, q which determines the patient's physical state. For the review, articles from 1999 to 2019, available in the Pubmed database, were selected from the descriptors "stroke", "homocysteine", "stroke review", "oxidative stress" and their variations. **Results:** Patients with stroke had high levels of homocysteinemia when compared to the control group ($p < 0.001$) adjusted for gender, ethnicity and age. In the subsequent analysis, when the groups were divided according to homocysteine levels, there were significant differences in relation to gender ($p < 0.001$), modified rankin scale at baseline ($p < 0.034$), and glucose ($p < 0.020$). In the analysis of oxidative stress markers, there was a tendency to decrease in NOx levels ($p < 0.071$) and a significant increase in TRAP ($p < 0.003$) in the group of patients with hyperhomocysteinemia. After the binomial logistic regression analysis, it was verified that glucose (0.017) and TRAP ($p < 0.019$) were independently associated with hyperhomocysteinemia in patients with stroke. **Conclusion:** Patients with stroke present high serum homocysteine levels. TRAP and glycemia are associated with hyperhomocysteinemia. With the review article, we conclude that there are a great number of references about the study of the AVE, however they are scarce when it

comes to the relationship between stroke, oxidative stress and homocysteine, making research and publications that expand this discussion of great import.

Key words: Stroke, Homocysteine, Oxidative Stress.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Esquema da interação entre lesão por isquemia/reperfusão e a produção e ação do estresse oxidativo na morte celular 24
- Figura 2** – Esquema do metabolismo de biossíntese da homocisteína e suas interações 27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação e discriminação dos fatores de risco associados à patogênese do AVE	19
Tabela 2 – Causas da elevação da homocisteína sérica	28

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AOPP	Produto de oxidação avançada de proteínas
ATP	Adenosina tri-fosfato
AVE	Acidente vascular encefálico
CC	Circunferência da cintura
COX2	Ciclooxigenase2
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ERN	Espécie reativa do nitrogênio
ERO	Espécie reativa do oxigênio
EUA	Estados Unidos da América
GPx	Glicoproteína X
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HMT	Homocisteinometiltransferase
IL-1	Interleucina1
IMC	Índice de massa corpórea
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
MAT	Metionina adenosiltransferase
MDA	Malondialdeído
MMP	Metaloproteinases da matriz
MTHFR	Metilenotetrahidrofolato–reductase
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NMDAN	Metil-d-aspartato
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
AOPP	Produto de oxidação avançada de proteínas
ATP	Adenosina tri-fosfato
AVE	Acidente vascular encefálico
CC	Circunferência da cintura
COX2	Ciclooxigenase2

DNA	Ácido desoxirribonucleico
ERN	Espécie reativa do nitrogênio
ERO	Espécie reativa do oxigênio
EUA	Estados Unidos da América
GPx	Glicoproteína X
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HMT	Homocisteinometiltransferase
IL-1	Interleucina1
IMC	Índice de massa corpórea
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
MAT	Metionina adenosiltransferase
MDA	Malondialdeído
MMP	Metaloproteinases da matriz
MTHFR	Metilenotetrahidrofolato–reductase
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NMDAN	Metil-d-aspartato
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	Acidente Vascular Encefálico	16
1.2	Prevalência no Brasil e no Mundo	17
1.3	Mecanismos Fisiopatológicos.....	18
1.4	Fatores de risco para o AVE	19
1.5	Estresse Oxidativo.....	20
1.6	Estresse Oxidativo e Acidente Vascular Encefálico	22
1.7	Homocisteína	26
2	JUSTIFICATIVA	30
3	OBJETIVO	31
3.1	Objetivo Geral	31
3.2	Objetivos Específicos	31
4	MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1	Participantes do estudo e dados clínicos	32
4.2	Medidas Antropométricas.....	33
4.3	Escala de Rankin Modificada	33
4.4	Biomarcadores Bioquímicos.....	34
4.5	Quimioluminescência iniciada por hidroperóxido de terc-butil.....	34
4.6	Determinação de produtos protéicos de oxidação avançada (AOPP).....	34
4.7	Capacidade Total Antioxidante plasmática.....	34
4.8	Determinação de metabólitos de óxido nítrico.....	35
4.9	Determinação de Homocisteína	35
4.10	Análise Estatística	35
5	Resultados	36
5.1	Artigo de Revisão	37
5.2	Artigo Original.....	44

6	CONCLUSÃO	62
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	62
8	REFERÊNCIAS	63
9	ANEXOS	73
9.1	Aprovação pelo comitê de ética em pesquisa envolvendo seres humanos da UEL.....	73
9.2	Termo de consentimento livre e esclarecido	74
9.3	Questionário para coleta de dados de pacientes e controles	76

1. INTRODUÇÃO

1.1 Acidente Vascular Encefálico

O acidente vascular encefálico (AVE) é uma das principais causas de morte em muitos países, sendo de alta importância clínica, social, política e econômica. Com o envelhecimento populacional, o AVE tornou-se uma das doenças com maiores índices de encargos de saúde globais, especialmente nos países de baixa e média renda (GLOBAL BURDEN OF DISEASE, 2015).

O AVE compreende o grupo de doenças neurológicas que mais afetam o sistema nervoso, sendo a maior causadora de incapacidade física e mental. É considerada uma doença geradora de sequelas e perda quase total de qualidade de vida, apresentando altas taxas de prevalência e incidência, bem como altas taxas de recidivas (COSTA et al., 2018).

O AVE possui duas formas principais de apresentação: o acidente vascular encefálico isquêmico, o mais frequente, e o acidente vascular encefálico hemorrágico, o mais grave. No momento desses eventos, diminui ou cessa por completo o suprimento de oxigênio e nutrientes, causando danos ao tecido cerebral caracterizado por morte celular rápida na microrregião e deficiência correspondente (SOMMER, 2017). A hemorragia intracerebral primária e o AVE lacunar representam coletivamente pequenos acidentes vasculares que compreendem aproximadamente um terço dos casos de AVE (TSAI, THOMAS, SUDLOW, 2013). Evidências crescentes apontam papel importante da inflamação como responsável pela insuficiência hemodinâmica em conjunto com a aterosclerose e outros fatores de risco que podem estar subjacentes às alterações vasculares (POGESSI, 2016).

Quando o fornecimento de oxigênio e nutrientes para a área afetada é diminuída após a isquemia, a produção de adenosina trifosfato (ATP) mitocondrial é extremamente reduzida (MANZANERO, SANTRO, ARUMUGAM, 2013). A reperfusão, onde ocorre a retomada do fluxo sanguíneo, pode sobrecarregar a respiração mitocondrial, levando a um pico na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) pelas mitocôndrias (MORO, 2005). Com o acúmulo de produtos tóxicos, como ERO e espécies de

1 reativas de nitrogênio (ERN), ocorre uma disputa entre vida e morte, pendendo
2 mais para esta última (CHEN, 2011).

3 Após a reperfusão, quando a oclusão é removida, seja
4 espontaneamente ou farmacologicamente, o sangue é restaurado para a área
5 afetada. Nesta fase, a entrega de oxigênio e glicose necessária para a geração
6 de ATP pode ocorrer, salvando o tecido cerebral, porém podendo permitir o
7 início de uma cascata de reações adversas. O estresse oxidativo resultante
8 causa cada vez mais danos e pode resultar na iniciação de cascatas de
9 ativação de vias necróticas e de morte celular apoptótica (MANZANERO,
10 SANTRO, ARUMUGAM, 2013).

11 O sintoma mais comum do AVE é fraqueza repentina e entorpecimento
12 da face e membros, no geral, em apenas de um lado do corpo; além disso,
13 pode ainda o paciente apresentar confusão, dificuldade em falar, enxergar e
14 andar. As manifestações clínicas de um AVE dependem de qual parte do
15 cérebro foi acometida e quão severamente foi afetada. A morte sobrevém
16 quando existe uma maior área lesada e a doença se apresenta com maior
17 gravidade (WHO, 2017).

18

19 **1.2 Prevalência no Brasil e no Mundo**

20

21 Em 2013, em todo o mundo, havia mais de 25 milhões de indivíduos que
22 tiveram AVE e sobreviveram e 6,5 milhões de mortes. Existindo uma
23 expectativa de 10,3 milhões de casos futuros. Os países em desenvolvimento
24 lideram o ranking de casos de AVE, tendo 75,2% de todas as mortes por AVE
25 relatadas no mundo. (VENKETASUBRAMANIAN et al., 2017).

26 Dentre todos os países da América Latina, o Brasil apresenta a maior
27 mortalidade em consequência de AVE (LOTUFO, 2005). No Brasil, são
28 registrados aproximadamente 100 mil óbitos por ano devido a AVE, sendo que
29 ocorre uma morte em consequência deste acometimento a cada 5 minutos
30 (CESÁRIO, PENASSO, OLIVEIRA, 2006). Estima-se que existam mais de dois
31 milhões de pessoas com AVE no Brasil (Brasil. Ministério da Saúde, 2014).
32 Bensenor e colaboradores (2015) mostraram que as taxas de prevalência
33 foram maiores para homens do que para mulheres, 1,6% e 1,4%

1 respectivamente, aumentando com o envelhecimento e chegando a 7,3% nos
2 grupos etários acima 75 anos de idade.

3 Em 2015, após pesquisa no Hospital Regional do Tucuruí, foi descrito a
4 entrada de 272 pacientes tendo como principal causa o AVE, uma média de 23
5 casos por mês, sendo observada ainda, uma predominância do sexo
6 masculino, mas sem diferença estatística (COSTA et al., 2018).

7 A situação crítica do AVE se dá pela sua alta prevalência, sendo a
8 segunda maior causa de mortes no mundo, superada apenas por doença
9 cardíaca (MURRAY, LOPEZ, 1997). Em países mais pobres e em
10 desenvolvimento isso se deve principalmente à falta de conscientização e
11 incentivos públicos sobre exames de rotina, serviços de rastreamento de
12 doenças crônico-degenerativas e certa falta de cuidados pessoais da própria
13 comunidade. Mesmo que o diagnóstico seja feito em tempo hábil, alguns
14 pacientes não seguem a prática padrão de acompanhamento. Ao mesmo
15 tempo, as configurações de cuidados terciários deficitários contribuem para o
16 uso de serviços de saúde médicos obsoletos e relativamente menos eficazes.
17 (NOMANI et al., 2017).

18 Essa doença é um grande obstáculo na saúde de vários países asiáticos
19 com grande população e países em desenvolvimento, que em breve terão a
20 maior prevalência de AVE, reflexo das disparidades nas provisões de cuidados
21 de saúde, o que torna um desafio ainda maior no controle da doença. Com o
22 aumento da expectativa de vida, o maior número de idosos, a redução da
23 mortalidade por doenças infecciosas e o aumento da prevalência de fatores de
24 risco nas pessoas desta economia em transição, o número de casos de AVE
25 na Ásia certamente aumentará (VENKETASUBRAMANIAN et al., 2017). Todos
26 esses fatores também refletem bem a situação atual do Brasil.

27

28 **1.3 Mecanismos Fisiopatológicos**

29

30 Os mecanismos moleculares ainda não são totalmente
31 compreendidos, mas existem evidências que ERO e ERN são importantes
32 atores nas ações que danificam o tecido cerebral. As espécies reativas
33 possuem significativo efeito na destruição e necrose de células, que inclui
34 peroxidação lipídica, desnaturação de proteínas e inativação de enzimas,

1 danos no DNA, liberação de Ca^{2+} e dano ao citoesqueleto. As células
2 apresentam mecanismos para eliminar os produtos tóxicos e regular a geração
3 de ERO. No entanto, o microambiente do AVE se torna insuficiente para lidar
4 com a carga oxidativa, mesmo com o aumento de enzimas neutralizantes,
5 levando a estágios de iniciação de necrose e apoptose (ALLEN,
6 BAYRAKTUTAN, 2009).

7 Existem vários mecanismos envolvidos na lesão tecidual neurológica,
8 dentre eles: a) Diminuição do estoque de energia celular, em consequência da
9 falha das mitocôndrias, o que pode desencadear a morte celular devido
10 à apoptose, causando também, perda de potássio e ATP, que são essenciais
11 para a troca de energia (KARASZEWSKI et al., 2009); b) Perda da função da
12 bomba de íons presente na membrana causa efeitos deletérios, levando ao
13 fornecimento inadequado de energia, resultando em edema de neurônios e
14 células da glia (DEB, SHARM, HASSAN, 2010); c) O glutamato desempenha
15 papel muito importante na plasticidade neuronal, entretanto na isquemia existe
16 uma liberação descontrolada a partir de uma transmissão sináptica excitotóxica
17 via ativação de N-metil-d-aspartato (NMDA), -amino-3-hidroxi-5-metil-4-
18 propionato (AMPA) ou receptores kainite, que permite o influxo de Na^+ e Ca^{2+} ,
19 o que leva a um efeito inverso na membrana neuronal (NAKANISHI, 2009);
20 d) Produção exacerbada de ROS, que reagem e danificam vários elementos
21 celulares e extracelulares, entre eles o endotélio vascular, ativando vias de
22 sinalização redox para iniciar a via apoptótica (DEB, SHARM, HASSAN, 2010).

23

24 **1.4 Fatores de risco para o AVE**

25

26 Com estudos de métodos mais acurados, é possível identificar e
27 categorizar os riscos para AVE, sendo eles: riscos não modificáveis, riscos
28 modificáveis e outros. A identificação e o controle de fatores de risco visam à
29 prevenção primária de AVE na população (ELKIND, SACCO, 1998) Chaves em
30 2000, compilou os riscos em uma tabela para melhor visualização e
31 entendimento.

32

33

1 Tabela 1: Classificação e discriminação dos fatores de risco associados à
 2 patogênese do AVE.

Riscos modificáveis	Riscos modificáveis	não Outros
Hipertensão	Idade	Álcool
Diabetes	Sexo	Anticorpo antifosfolípídeo
Tabaco	Raça	Homocisteína elevada
Fibrilação atrial	Etnia	Processo inflamatório
Doenças cardíacas	Hereditariedade	Infecção
Hiperlipidemias		
Sedentarismo		
Estenose carótida		
Ataques isquêmicos		

3 FONTE: Chaves, 2000.

4

5 A hipertensão se mostra como principal fator de risco para AVE. O risco
 6 aumenta quando o paciente apresenta insuficiência cardíaca; entretanto em
 7 países desenvolvidos, a doença coronariana é mais comum e letal (SACCO,
 8 WOLF, GORELICK, 1999).

9 Outro importante fator de risco é o diabetes, especialmente no infarto
 10 cerebral aterotromboembólico. Os mecanismos etiopatogênicos de AVE nos
 11 diabéticos se devem a alterações da hemodinâmica cerebral, à hiperglicemia e
 12 a outros fatores de risco associados. Constitui risco através de mecanismos
 13 aterogênicos diretos e por interagir com fatores como hipertensão e
 14 hiperlipidemia (CHUKWUMA, TUOMILEHTO, 1993).

15 Muitos estudos tem observado que o tabagismo é um fator de risco
 16 muito favorável para o AVE, tendo uma relação direta com hipertensão,
 17 intolerância à glicose, diabetes, hipercolesterolemia e com doenças
 18 cardiovasculares preexistentes (MUNTHER, ALDOORI, 1998).

19 Entre outros fatores de risco existem a fibrilação atrial e as demais
 20 apresentadas na tabela 1. Um estudo, ainda demonstrou uma maior taxa de
 21 incidência em populações caucasianas. Na população negra, um estudo
 22 desenvolvido nos Estados Unidos da América, identificou que a mortalidade foi
 23 maior nessa população (THORVALDSEN et al., 1995).

24 Os fatores genéticos demonstram importância significativa na
 25 patogênese da hemorragia subaracnóide. A questão genética incide em 5%

1 dos indivíduos com história paterna e em 4% entre os pacientes com história
2 de AVE maternos (LIAO et al.,1997).

3 Já é bem estabelecido o papel dos anticoncepcionais orais como fatores
4 de risco independente para AVE isquêmico e hemorrágico, principalmente em
5 mulheres que fumam, tenham mais de 35 anos de idade ou que tenham
6 história de hipertensão (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1996).

7

8 **1.5 Estresse Oxidativo**

9

10 A produção de ERO e ERN, entre outras espécies reativas, é parte
11 integrante do metabolismo humano, principalmente o respiratório, e é
12 observada em diversas condições fisiológicas. Essas moléculas têm importante
13 função biológica, como na fagocitose, quando essas espécies são produzidas
14 para eliminar o agente agressor. O estresse oxidativo resulta do desequilíbrio
15 entre o sistema produtor de moléculas oxidantes e produção de antioxidante,
16 com o predomínio do primeiro (VASCONCELOS et al., 2007).

17 O estresse oxidativo é um importante mediador de lesão do tecido
18 isquêmico. Os radicais livres causam principalmente desestruturação do
19 citoesqueleto, alteração das bombas iônicas e peroxidação dos ácidos graxos
20 presentes nas membranas celulares. Eles agem por diversos mecanismos
21 como: oxidação de grupos sulfidril que levam à inativação de enzimas,
22 alterações do DNA que podem levar à inibição da síntese de ATP e o consumo
23 das reservas de NAD⁺. Os radicais livres também podem agir na inativação
24 direta do óxido nítrico (NO), o que compromete o relaxamento vascular. Assim,
25 o NO, presente nesse microambiente tóxico, pode reagir com o ânion
26 superóxido produzindo peroxinitrito, uma molécula altamente reativa que ativa
27 citocinas pró-inflamatórias como a interleucina-1 (IL1) (MENDES, SILVEIRA,
28 GALVÃO, 2008 e CAMPOS, YOSHIDA, 2004).

29 Os radicais livres promovem um distúrbio em várias funções
30 mitocondriais, como a inibição de mecanismos de transporte de elétrons e
31 despolarização da membrana, levando à produção excessiva de superóxido.
32 Além disso, o aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial leva à
33 tumefação dessa organela e à liberação de moléculas pró-apoptóticas. O
34 estresse oxidativo está intimamente relacionado à excitotoxicidade, perda de

1 energia e desbalanceamento iônico, sendo todos esses eventos promotores de
2 lesão tecidual neural (KUNZ, DIRNAGL, MERGENTHALER, 2010).

3
4 O estresse nitrosativo é causado pelo aumento da produção de NO a
5 partir da isoforma óxido nítrico sintase induzível (iNOS). Estas espécies
6 reativas, estão intimamente envolvidas em doenças crônicas não
7 transmissíveis como doenças cardiovasculares, diabetes, hipertensão,
8 síndrome metabólica, artrite reumatóide e doenças neurodegenerativas. A
9 lesão tecidual ocorre, uma vez que as ERN em excesso reagem com proteínas,
10 lipídeos e DNA (FERRARI, FRANÇA, HONORIO-FRANÇA, 2009 e
11 VASCONCELOS et al., 2007).

12 O NO é uma pequena molécula, sintetizada com a ajuda do óxido nítrico
13 sintase (NOS), agindo sobre a guanidina do grupo L-arginina para produção de
14 L-citrulina (MARLETTA, HURSHAMN, RUSCHE, 1997) (BARRACHINA,
15 PANÉS, ESPLUGUES, 2001).

16 A interação de ROS com fosfolipídeos na membrana mitocondrial das
17 células também pode levar à disfunção mitocondrial e afetar o metabolismo
18 energético (ZHAO, 2018). A diminuição de ATP desencadeia comprometimento
19 funcional de canais de cálcio dependentes de ATP, levando á sobrecarga de
20 cálcio celular e mitocondrial que por sua vez pode desencadear estímulo
21 excessivo de neurotransmissores (excitotoxicidade) como, por exemplo, de
22 glutamato (MANZANERO, SANTRO, ARUMUGAM, 2013).

23 Por outro lado, à medida que as células devem sofrer respiração
24 anaeróbica na ausência de oxigênio, o lactato formado a partir de piruvato via
25 lactato desidrogenase se acumula, o que resulta em uma diminuição do pH
26 celular e do fechamento do poro de transição de permeabilidade
27 mitocondrial(SIMS, ANDERSON, 2002). O citocromo C ativa as vias de morte
28 celular e causa morte do tecido (CIRCU, AW, 2010). Além disso, a produção de
29 ERO poderia acentuar ainda mais a apoptose celular, pois ERO podem induzir
30 o estresse oxidativo e prejudicar as funções proteicas (ZHENG et al., 2016).

31 Como a produção de ERO é inevitável durante o metabolismo aeróbio,
32 dois mecanismos principais foram desenvolvidos pelas células como um
33 sistema de defesa antioxidante: 1) produção de proteínas com funções
34 antioxidantes; e 2) o aumento da produção dos proteassomas20S para
degradar proteínas oxidadas (PICKERING, 2012).

1 Os níveis de ERO também são contrabalançados por moléculas
2 antioxidantes tais como glutathionaperoxidase (GPx), catalase e superóxido
3 dismutase (MADAMANCHI, VENDROV, RUNGE, 2005).

4 O produto de oxidação avançada de proteínas (AOPP) é um marcador
5 de oxidação descrito no estresse oxidativo, e seu envolvimento é reconhecido
6 em doenças associadas à oxidação (WITKO-SARSAT et al., 1996). O AOPP é
7 o produto da reação de estresse oxidativo entre a albumina e o ácido
8 hipocloroso, que é um importante marcador de dano proteico mediado pela
9 oxidação refletindo o estado de estresse oxidativo do indivíduo (NASRALLAH et
10 al., 2013).

11 **1.6 Estresse Oxidativo e Acidente Vascular Encefálico**

12
13
14 O cérebro é altamente sensível ao estresse oxidativo, pois possui
15 grande quantidade de ácidos graxos insaturados, grande reserva de ferro, alta
16 taxa de metabolização de oxigênio e apresenta um sistema de defesa
17 vulnerável e ineficiente contra ERO, o que propicia o advento de lesões com
18 muita facilidade (CRACK, TAYOR, 2005 e TARDINI, YOSHIDA, 2003 e ALLEN,
19 BAYRAKTUTAN, 2009), havendo crescente evidência de que a NADPH
20 oxidase seja a principal fonte citosólica de geração de ERO no AVE isquêmico
21 (KAHLES, BRANDES, 2013).

22 O estresse oxidativo é um importante contribuinte para as sequelas
23 fisiopatológicas do AVE. Em um estudo realizado com 200 pacientes foi
24 observado uma correlação do nível de malondialdeído (MDA) com o tamanho
25 do infarto, a gravidade clínica do curso da doença e o desfecho do
26 paciente, sugerindo que após o AVE o estresse oxidativo é progressivo e
27 contribui para danos neurológicos adicionais. Por outro lado, o sistema de
28 defesa antioxidante, medido pela atividade da enzima superóxido dismutase
29 (SOD), se correlacionou inversamente com o tamanho do infarto e a gravidade
30 do dano neurológico (TSAI et al., 2014).

31 Após o AVE existe um envolvimento de lesão secundária, a qual aciona
32 vias de cascatas de lesão tecidual que exacerbam os danos no tecido,
33 incluindo inflamação, excitotoxicidade, estresse oxidativo, perda da
34 homeostase de íons e aumento da permeabilidade da barreira

1 hematoencefálica, evoluindo drasticamente depois do derrame(SORBY-
2 ADAMS et al., 2017).

3 Kotur-Stevuljevic e colaboradores em 2015 realizaram uma pesquisa
4 com 185 indivíduos com AVE e 185 indivíduos saudáveis, onde observaram
5 que o estresse oxidativo era mais alto no grupo com AVE do que no grupo
6 controle, principalmente os níveis de AOPP e produtos de danos oxidativo de
7 lipídios, sendo a proteção antioxidante mais baixa nos indivíduos com AVE.

8 Em excesso, as ROS levam a neurodegeneração e quebra da barreira
9 hematoencefálica e via de apoptose neuronal. No AVE, esses efeitosdevem-se
10 ao aumento direto do estresse oxidativo no local da isquemia ou indireto onde
11 aumentam devido à modificações de variáveis fisiológicas(RADERMACHER et
12 al.,2012).

13 O estresse oxidativo que é formado a partir da isquemia/reperfusão
14 causa disfunção endotelial, atuando pela via do Nox2, aumentando sua
15 expressão e atividade na artéria cerebral. Esta disfunção endotelial parece
16 ocorrer devido à vasodilatação que é altamente prejudicada pelo NO (DE
17 SILVA et al., 2011).

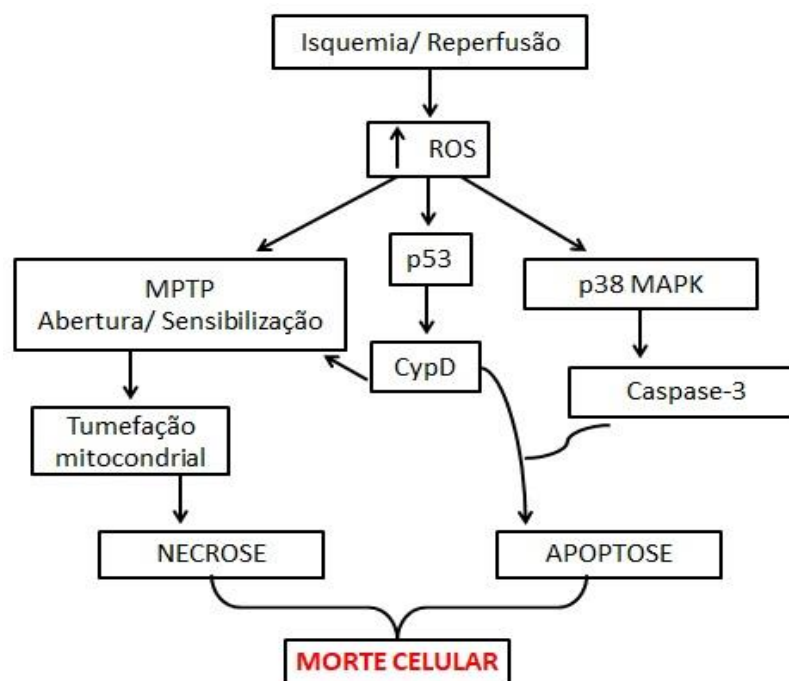
18 O NO é um importante mediador endógeno, principalmente para a
19 manutenção do fluxo sanguíneo cerebral e como protetor do endotélio local.
20 Um amplo perfil de ações fisiológicas e patológicas é regulado pelo NO,
21 tornando-o uma molécula pleiotrópica (PACHER, BECKMAN, LIAUDET, 2007).

22 A atividade da NOS é encontrada em muitos tecidos, incluindo endotélio,
23 células musculares lisas vasculares, miocárdio, macrófagos, neutrófilos e
24 nervos periféricos (BARRACHINA, PANÉS, ESPLUGUES, 2001). No cérebro,
25 as isoformas de NOS mais encontradas são a endotelial (eNOS) e a neuronal
26 (nNOS), sendo essenciais para o controle do fluxo sanguíneo, atuação como
27 neurotransmissor, envolvimento na plasticidade sináptica e formação de
28 memória, entre outros (PACHER, BECKMAN, LIAUDET, 2007).

29 Após o AVE, a produção de NO pode desempenhar uma ação protetora
30 e/ou destrutiva (TAFFI, 2008). Em estágios iniciais de lesão cerebral, de
31 qualquer etiologia, ocorre depleção de algumas isoformas de NO,
32 simultaneamente com a redução do fluxo sanguíneo (GARRY et al., 2015).

33 Em várias condições patológicas a forma de NO induzível (iNOS) é
34 sintetizada em maior escala, sendo sua expressão induzida por citocinas

1 inflamatórias presentes no microambiente (PACHER, BECKMAN, LIAUDET,
 2 2007). Existem evidências de que o NO derivado de eNOS confere proteção
 3 após lesão cerebral enquanto o NO sintetizado de iNOS contribui para danos
 4 adicionais (GARRY et al., 2015).



19 FIGURA 1: Esquema da interação entre lesão por isquemia/reperusão e a
 20 produção e ação do estresse oxidativo na morte celular.

21 FONTE:Manzanero, Santro, Arumugam, 2013 (adaptado).

22
 23 É da ciência básica o conceito de que o estresse oxidativo leva a
 24 necrose e apoptose. O estresse oxidativo é um dos principais contribuintes
 25 para os mecanismos de morte celular na lesão de isquemia/reperusão.
 26 Contribui ainda para a abertura do poro de transição de permeabilidade
 27 mitocondrial (MPTP) diretamente através da oxidação de proteínas chaves ou
 28 através da ativação do gene p53. O gene p53 liga-se à proteína do poro
 29 ciclofilina D (cypD) que desencadeia a abertura do poro, bloqueando a cadeia
 30 respiratória mitocondrial e causando inchaço e necrose mitocondrial. O
 31 estresse oxidativo e o gene p53 também podem iniciar as cascatas de
 32 apoptose, sendo que alguns dos mediadores mais relevantes são a p38, MAPK
 33 e a Caspase-3 (MANZANERO, SANTRO, ARUMUGAM, 2013).

1 Taffi e cols em 2008 demonstraram que os metabólitos de NO mensurado
2 24 horas após o início dos sintomas do AVE era maior se comparados com
3 indivíduos saudáveis. Os níveis plasmáticos desses metabólitos foram
4 associados a evolução desfavorável no acidente vascular cerebral não lacunar,
5 tornando-se um marcador de dano cerebral.

6 O estresse oxidativo neuronal está fortemente ligado à ativação de
7 nNOS, que sintetiza NO. O NO, por sua vez, reage com o O₂ para produzir
8 peroxinitrito, um potente oxidante de proteínas e lipídios (MANZANERO,
9 SANTRO, ARUMUGAM, 2013) que exhibe uma ampla gama de efeitos
10 prejudiciais aos tecidos (NANETTI, TAFFI, VIGNINI, 2007).

11 Pesquisadores demonstraram que os níveis de danos causados por
12 peroxinitrito aumentaram significativamente após 2h de isquemia em ratos, e
13 continuou aumentando com a reperfusão até 48h. Uma vez sintetizado e
14 estabelecido no cérebro com isquemia, o peroxinitrito pode exercer seus efeitos
15 tóxicos através de uma variedade de mecanismos de dano, como peroxidação
16 lipídica, dano mitocondrial, nitração e oxidação de proteínas, depleção de
17 reservas antioxidantes e danos ao DNA (PACHER, BECKMAN, LIAUDET,
18 2007).

19 Na isquemia, o oxigênio se esgota antes da glicose, pelo fato de que a
20 pressão intersticial de oxigênio na penumbra, a área do cérebro parcialmente
21 irrigada por vasos colaterais que circundam o núcleo agudamente lesado,
22 diminuir para 33% em apenas 1 hora após a isquemia (LIU et al., 2004). Isso
23 favorece a via glicolítica como meio de produção de ATP anaeróbico (HERTZ,
24 2008). A consequência é um acúmulo de ácido láctico favorecendo a acidose,
25 que promove mudanças pró-oxidantes e prejudiciais aos neurônios, como a
26 inativação de defesas antioxidantes, liberação de ferro oxidante de proteínas
27 (YING et al., 1999), e aumento do glutamato levando a toxicidade
28 celular (LEWERENZ et al., 2010).

30 **1.7 Homocisteína**

31
32 A homocisteína é um aminoácido sulfurado (que contém enxofre)
33 produzido dentro das células pela perdedeum grupamento metil (CH₃)
34 originário do aminoácido metionina, sendo este último proveniente da dieta ou

1 produzido pelo próprio organismo. Está bem estabelecido que a homocisteína
2 plasmática elevada seja um fator de risco vascular (OIKONOMIDI et al. 2016).

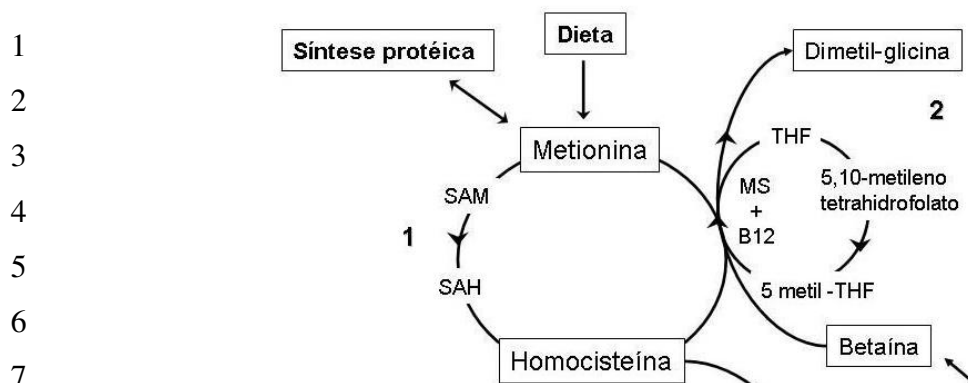
3 O aminoácido homocisteína foi descoberta em 1932, e devido a ter
4 propriedades químicas com grande semelhança com asparacisteína e fazer parte
5 do seu metabolismo, recebeu o nome de homocisteína (GANGULY, ALAM,
6 2015).

7 É um produto intermediário na biossíntese normal dos aminoácidos
8 metionina e cisteína (FAEH, CHIOLERO, PACCAUD, 2006). Ele é produzido a
9 partir da desmetilação do aminoácido metionina, o qual é abundante em
10 proteínas de origem animal (VENES, CLARENCE, 2005).

11 Na circulação, encontra-se no plasma sob quatro formas distintas, onde
12 1% circula livremente como tiol, 70 a 80% estão presentes nas proteínas
13 plasmáticas, permanecendo dissulfurado principalmente na albumina e 20 a 30
14 % se combina formando dímeros de homocisteína (HANKEY, EIKELBOOM,
15 1999).

16 Como mostrado na figura 2, a homocisteína tem um papel chave nesse
17 nicho bioquímico. Ocorre a metilação da metionina, que sofre S-adenosilação e
18 forma S-adenosilmetionina (SAM). Sendo a S-adenosilmetionina o principal
19 doador de metil para todas as reações de metilação nas células (LOSCALZO,
20 HANDY, 2014). A ligação da metionina com o ATP proporciona à formação de
21 SAM, onde seu grupo metil pode ser ligado ao enxofre, podendo causar a
22 metilação de outras substâncias. Esta ação libera energia, tornando-se
23 irreversível. Já a desmetilação leva a formação de S-adenosil-homocisteína
24 (SAH), ou seja, um tioéter análogo à metionina (HARVEY, FERRIER, 2011).

25
26
27
28
29
30
31
32
33



8 FIGURA 2: Esquema do metabolismo de biossíntese da homocisteína e suas
9 interações.

10 FONTE: Deminice, et al., 2007 (adaptado).

11
12 O produto intermediário do metabolismo da metionina é originado pela
13 ação da enzima metionina adenosiltransferase (MAT). Por sua vez, a metionina
14 pode ser regenerada a partir da homocisteína por reações de remetilação e
15 com a catálise da enzima homocistenometiltransferase (HMT) (BAYNES,
16 DOMINICZAK, 2005).

17 No corpo humano, 70% da homocisteína se liga à albumina em várias
18 formas: homocisteína reduzida, oxidada e disulfetos mistos. Tal aminoácido
19 pode ser quantificado em laboratório a partir de uma amostra de sangue em
20 jejum, onde os limites aceitáveis variam de 5 a 15 $\mu\text{mol/L}$. O aumento da
21 homocisteína sérica, a hiperhomocisteinemia é comum, sendo classificada em
22 níveis moderados (15-30 $\mu\text{mol/L}$), intermediários (31-100 $\mu\text{mol/L}$) ou graves
23 (>100 $\mu\text{mol/L}$). As causas da elevação da homocisteína são variadas, podendo
24 ser genéticas ou adquiridas, como podemos ver na tabela 2 (MUDD et al.,
25 2000).

26 No Brasil em 2003 foi desenvolvido um estudo que revelou uma alta
27 prevalência de hiperhomocisteinemia em indivíduos nipo-brasileiros portadores
28 de arteriopatia periférica aterosclerótica, sendo o sexo masculino o mais
29 acometido (GARÓFOLO et al., 2003).

30 Em estudo com pacientes com AVE isquêmico, verificou-se a existência
31 de valores de homocisteína plasmática mais altos do que o relatado no grupo
32 controle, o que traz evidências sobre a associação entre níveis de
33 homocisteína plasmáticos e a ocorrência de AVE. Neste estudo, ainda foi
34 relatado a associação significativa entre os níveis de homocisteína e a faixa

1 etária de 40 a 59 anos e a maior prevalência em indivíduos com doenças
2 aterogênicas (HARBOE-GONÇALVES, VAZ, BUZZI, 2005).

3

4 QUADRO 2: Causas da elevação da homocisteína sérica.

5 Causas Genéticas

- 6 Deficiência de MTHFR (mutação C677T termolábilhomozigótica) (10%)
- 7 Defeito de MTHFR (mutação termoestável homozigótica) (raro)
- 8 Deficiência de CBS (heterozigóticos) (raro)
- 9 Defeito de CBS (homocisteinúria – homozigótico) (raro)
- 10 Deficiência funcional de sintase metionina (rara)

11 Causas nutricionais

- 12 Deficiência de ácido fólico
- 13 Deficiência de vitamina B12
- 14 Deficiência de vitamina B6
- 15 Excesso de proteína animal rica em metionina

16 Transtornos sistêmicos

- 17 Doença renal
- 18 Câncer
- 19 Hipotireoidismo
- 20 Psoríase
- 21 Diabetes mellitus
- 22 Fase aguda de infarto

23 Fatores Fisiológicos

- 24 Idade avançada
- 25 Sexo masculino
- 26 Menopausa
- 27 Etnia

28 Drogas

- 29 Anticonvulsivantes
- 30 Contraceptivos orais
- 31 Metotrexate
- 32 Óxido Nítrico
- 33 Trimetropim
- 34 Sulfasalazina
- 35 Drogas redutoras de lipídios

36 Fatores de estilo de vida

- 37 Tabagismo
- 38 Abuso de álcool
- 39 Inatividade física
- 40 Dieta

41 FONTE: Sachdev, 2004 (adaptado).

42

43 Na China, não é obrigatório a suplementação para evitar eventual
44 hiperhomocisteinemia e provável AVE, por isso inúmeros trabalhos são
45 desenvolvidos com essa população. Em estudo de prevenção primária do AVE
46 na China, foram analisados mais de 16 mil pacientes. Observou-se que nos

1 pacientes com hipertensão que apresentavam níveis normais ou baixos de
2 homocisteína ocorria uma diminuição no risco de um primeiro episódio de AVE,
3 podendo servir como um indicador útil para a eficácia do tratamento com ácido
4 fólico na prevenção do AVE (HUANG et al.,2017).

5 ANNIWAERR e colaboradores em 2018 fizeram uma análise de 231
6 pacientes com AVE entre os anos de 2011 e 2013, concluindo que os níveis
7 aumentados de homocisteína foi um fator de risco para AVE recorrente.

8 Alterações genotípicas no gene metileno tetrahidrofolato redutase
9 (MTHFR) alteram os níveis de homocisteína, levando a uma relação
10 independente para o aumento do risco de AVE. Ensaios clínicos mostram que
11 a suplementação com vitamina B12 reduz a homocisteína em 25% reduzindo o
12 risco de AVE em cerca de 10% (HANKEY, 2018).

13 Experimentalmente, a homocisteína aumenta a vazão de albumina pelos
14 vasos biliares, ativando as metaloproteinases da matriz (MMP), que degradam
15 ainda mais a matriz extracelular (KUMAR et al., 2008).As MMPspertencema
16 família de endopeptidases que contem zinco e degradam as proteínas e
17 moléculas da junção oclusiva da matriz extracelular no cérebro. Este processo
18 aumenta a formação da fenda celular endotelial e leva aoaumentoda
19 permeabilidade da barreira hematoencefálica (KALANI et al., 2014).

20

21

2. JUSTIFICATIVA

A produção exacerbada de estresse oxidativo está ligada à fisiopatologia de diversos processos patológicos e uma variada situação de toxicidade. Estudos experimentais indicam que células endoteliais encubadas com níveis elevados de homocisteína podem promover a formação de ERO, principalmente o anion superóxido. Isso ocorre pela auto-oxidação da homocisteína ou da cisteína, levando à danos celulares importantes, existindo ainda relatos de que a homocisteína causa distúrbios significativos no sistema de defesa antioxidante, por exemplo, nas enzimas glutathionaperoxidase e superóxido dismutase (WEISS, 2005).

Assim, considerando a escassa literatura que existe sobre os níveis de homocisteína em pacientes com AVE, bem como a inexistência de trabalhos que tenham avaliado a associação de homocisteína e estresse oxidativo em pacientes com AVE, colocamos a seguir os objetivos do presente trabalho.

1 3. OBJETIVOS

2

3 3.1 Objetivo Geral

4

5 Avaliar os níveis de homocisteína em pacientes com AVE e sua possível
6 associação com biomarcadores de estresse oxidativo.

7

8 3.2 Objetivos Específicos

9

- 10 • Determinar os níveis de homocisteína nos pacientes com AVE e grupo
11 controle;
- 12 • Classificar os pacientes segundo a escala de Rankin modificada;
- 13 • Avaliar os biomarcadores do estresse oxidativo e metabólitos de NO em
14 pacientes com AVE de acordo com os níveis séricos de homocisteína;
- 15 • Avaliar e comparar os níveis séricos de homocisteína entre pacientes
16 com AVE e indivíduos do grupo controle;
- 17 • Revisar os mecanismos do estresse oxidativo envolvidos no AVE (artigo
18 1);

19

20

21

22

23

24

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Participantes do estudo e dados clínicos

Cento e setenta pacientes com AVE e duzentos e vinte indivíduos controles no Hospital Universitário de Londrina da Universidade Estadual de Londrina.

Inicialmente, foram comparados os níveis de homocisteína dos pacientes com AVE e dos controles. A seguir, os pacientes com AVE foram divididos em dois grupos de 85 pacientes, a partir da mediana, onde valores menores que 13,59 foram classificados como homocisteinemia normal e igual ou superior a $\geq 13,59$ foram classificados como pacientes com hiperhomocisteinemia.

Os dados demográficos e os biomarcadores metabólicos foram analisados nos dois grupos de pacientes com acidente vascular encefálico apresentando homocisteinemia normal e com hiperhomocisteinemia.

Em todos os grupos foram avaliados idade, sexo, etnia e índice de massa corporal (IMC). Nenhum dos pacientes foi colocado em uma dieta específica ou estavam recebendo suplementos antioxidantes.

Nenhum dos participantes do estudo tinha achados clínicos ou laboratoriais de doenças cardíacas, tireoidianas, renais, hepáticas, gastrointestinais ou oncológicas. Pacientes com várias condições que poderiam interferir nos valores de homocisteína, como insuficiência renal, hipotireoidismo e hemólise ou uso de drogas, como fenitoína, isoniazida, metotrexato e L-dopa (Panunzio et al., 2003) foram excluídos do estudo.

Todos os pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (anexo), e o protocolo do estudo foi integralmente aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil, sob o número CAAE 0250.0.268.000-11.

4.2 Medidas antropométricas

O peso corporal foi medido com precisão de 0,1 kg usando-se uma balança eletrônica, com indivíduos vestindo roupas leves, mas sem sapatos, pela manhã; a altura foi medida com precisão de 0,1 cm usando um estadiômetro. O IMC foi calculado como peso (kg) dividido pela altura (m) ao quadrado. A circunferência abdominal (CA) foi medida com uma fita na região entre a última costela e a crista ilíaca, sempre na posição ortostática. Três medidas de pressão arterial usando um esfigmomanômetro calibrado foram tomadas com um intervalo de 1 min após o participante ter sido sentado e foram registrados no braço esquerdo. A média dessas medidas foram utilizadas nas análises.

4.3 Escala de Rankin modificada

A escala de Rankin modificada é a medida de resultado funcional mais prevalente na pesquisa contemporânea de acidente vascular cerebral. A escala de possui seis níveis, abrangendo toda a gama de resultados funcionais desde ausência de sintomas até a morte. Como visto na tabela a seguir

TABELA 1. Detalhamento da classificação da Escala de Rankin Modificada

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

FONTE: Joseph P. Broderick, JP; Adeoye, O; Elm, J, 2017 (adaptado e traduzido).

1 **4.4 Biomarcadores bioquímicos**

2
3 Após jejum de 12 horas, os indivíduos foram submetidos à análise
4 laboratorial do sangue avaliada por meio de um autoanalisador bioquímico
5 (Dimension Dade AR DadeBehring, Deerfield, IL, EUA) usando kits
6 DadeBehring®: colesterol total, HDL, LDL, triacilglicerol (TG) e glicose. O nível
7 de insulina no plasma foi determinado por imunoensaio de micropartículas de
8 quimiluminescência (Architect, AbbottLaboratory, Abbott Park, IL, EUA).

9 10 **4.5 Quimiluminescência iniciada por hidroperóxido de terc-butil**

11
12 Os níveis plasmáticos de hidroperóxido lipídico foram avaliados por
13 quimiluminescência iniciada com hidroperóxido de terc-butil (CL-LOOH) como
14 descrito anteriormente (GONZALEZ, LLESUY & BOVERIS, 1991), e os
15 resultados foram expressos em unidades relativas de luz.

16 17 **4.6 Determinação de produtos proteicos de oxidação avançada** 18 **(AOPPs)**

19
20 Os AOPPs foram determinados no plasma utilizando o método semi-
21 automatizado (WITKO-SARSAT et al., 1996). As concentrações de AOPP
22 foram expressas como micromoles por litro ($\mu\text{mol/L}$) de equivalentes de
23 cloraminas-T.

24 25 **4.7 Capacidade total antioxidante plasmática (TRAP)**

26
27 A capacidade antioxidante total plasmática foi avaliada por
28 porquimioluminescência (QL), utilizando a metodologia *total radical-*
29 *trappingantioxidantparameter* (TRAP), em uma adaptação da técnica descrita
30 por Repetto et al (REPETTO et al., 1996). Este método detecta antioxidantes
31 no plasma hidrossolúveis e/ou lipossolúveis, medindo o tempo de inibição da
32 quimiluminescência induzida por 2,2-azobis (2-amidinopropano). O sistema foi
33 calibrado com o Trolox análogo da vitamina E. Os níveis séricos de ácido úrico
34 foram determinados usando um auto-analisador bioquímico (Dimension Dade

1 AR; DadeBehring) e foram usados para corrigir os valores de TRAP. As
2 medições de TRAP em condições associadas à hiperuricemia, como a SM,
3 podem ser imprecisas, pois a concentração de ácido úrico é responsável por
4 60% da capacidade antioxidante total do plasma. Assim, uma correção de
5 TRAP com base na concentração de ácido úrico foi realizada (VENTURINI et
6 al., 2012).

7

8 **4.8 Determinação de metabólitos de óxido nítrico**

9

10 Os níveis séricos de metabólitos do óxido nítrico (NOx) foram avaliados
11 pela concentração de nitrito (NO₂⁻) de acordo com a reação de Griess,
12 suplementada pela redução do nitrato a nitrito com cádmio (GUEVARA et al.,
13 1998 e NAVARRO-GONZÁLVEZ, GARCÍA-BENAYAS & ARENAS, 1998).

14

15 **4.9 Determinação de homocisteína**

16

17 Os níveis plasmáticos de homocisteína foram determinados por
18 imunoensaio de micropartículas de quimioluminescência (Architect,
19 AbbottLaboratory, Abbott Park, IL, EUA).

20

21 **4.10 Análise Estatística**

22

23 Os dados categóricos foram avaliados pelo teste de qui-quadrado e os
24 dados expressos em numero absoluto (%). Para verificar a distribuição dos
25 dados foi utilizado teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Para avaliar a
26 homogeneidade das variâncias foi utilizado teste de Levene. Os dados
27 paramétricos foram avaliados pelo teste de t de Student e expressos como
28 média (\pm desvio padrão) (DP). Dados não paramétricos foram avaliados pelo
29 teste de Mann-Whitney e expressos como mediana e interquartis (25%-75%). A
30 diferença estatística foi considerada quando $p < 0,05$. Para determinar
31 associações foi realizada a regressão logística binominal. Foram incluídas nos
32 testes de regressão logística binominal as variáveis que apresentaram valor de
33 $p < 0,1$ na análise univariada. Oddsratio (OR) e intervalo de confiança (IC) de

1 95% foram demonstrados. Todas as análises foram realizadas utilizando o
2 programa estatístico SPSS versão 20.0 (IBM EUA).

3

4

5

1 **5 RESULTADOS**

2 Os resultados obtidos foram apresentados e discutidos em dois artigos
3 científicos:

4 Artigo de revisão: Importância do Estresse Oxidativo no Acidente
5 vascular Encefálico publicado na revista Brazilian Journal of Surgery and
6 Clinical Reseach 2019; 26 (3): 71- 7.

7 Artigo original: Elevated Plasma Homocysteine Levels and its Relation
8 with Oxidative Stress in Patients with Stroke encaminhado para a Revista
9 Brasileira de Neurologia e Psiquiatria.

10

11

12 **5.1 Artigo de Revisão**

13

14 As buscas foram realizadas nas bases de dados bibliográficas —
15 PubMed e LILACS. Ao finalizar as pesquisas em cada base, as referências
16 duplicadas foram excluídas. Foram selecionados artigos publicados entre 1996
17 e 2019, visto que alguns poucos artigos, mesmo que antigos, eram de grande
18 valia para entendimento geral do contexto. Foram selecionados artigos escritos
19 em inglês e espanhol.

20 Há problemas e diferenças nos processos de indexação nas bases de
21 dados bibliográficas; portanto, optou-se pela busca por termos livres, sem o
22 uso de vocabulário controlado (descritores). Com essa estratégia, houve uma
23 recuperação de um número maior de referências, garantindo a detecção da
24 maioria dos trabalhos publicados dentro dos critérios pré-estabelecidos.

25

5.2 Original Article

ELEVATED PLASMA HOMOCYSTEINE LEVELS AND ITS RELATION WITH OXIDATIVE STRESS IN PATIENTS WITH STROKE

Luana Aparecida Cossentini, Msc

PhD student at the Postgraduate Program in Experimental Pathology of the
University of Londrina

Sayonara Rangel Oliveira, PhD

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

Andréa Name Colado Simão, PhD

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

Isaias Dichi, MD, PhD

Department of Internal Medicine - University of Londrina, Londrina, Paraná,
Brazil

Corresponding Author: Isaias Dichi

Address: Robert Koch street n. 60, Airport, Department of Internal Medicine,
Health Sciences Center, University of Londrina. Londrina, Parana, Brazil.

Phone: 43 33712234

E-mail: dichi@sercomtel.com.br

1 **Abstract**

2

3 **Background:** Elevated plasma homocysteine levels have been indicated as an
4 independent risk factor for ischemic stroke. **Objective:** The objective of this
5 study was to evaluate oxidative and nitrosative stress in patients with ischemic
6 stroke with and without hyperhomocysteinemia (HHcy) and to verify whether
7 HHcy is associated with oxidative stress in these patients. **Methods:** This study
8 included 170 stroke patients, who were divided according to their levels
9 of homocysteine (Hyperhomocysteinemia $\geq 13.59 \mu\text{mol/L}$) and 220 healthy
10 individuals (control group). **Results:** Stroke patients showed high levels of
11 homocysteinemia when compared to the control group ($p < 0.001$) adjusted for
12 the variables: sex, ethnicity and age. Patients with stroke and
13 hyperhomocysteinemia showed higher frequency of male subjects ($p=0.001$),
14 lower Rankin scale ($p=0.034$), and lower glucose levels ($p=0.020$) when
15 compared with stroke patients with lower levels of homocysteine. Patients with
16 ischemic stroke and hyperhomocysteinemia had a trend to reduced NOx ($p=$
17 0.071) and increased TRAP ($p= 0.003$) levels when compared to the patients
18 without hyperhomocysteinemia. The binomial logistic regression analysis
19 showed that sex ($p=0.032$), glucose ($p=0.017$) and TRAP ($p=0.019$) were
20 independently associated with hyperhomocysteinemia in patients with stroke.
21 **Conclusion:** This is the first study in which homocysteinemia and oxidative
22 and nitrosative stress markers were investigated in stroke patients. HHcy were
23 associated with male sex, decreased glucose and increased TRAP. More
24 studies are necessary to elucidate the complex relationship between
25 homocysteine and redox status in these patients.

26

27 **Key words:** Ischemic Stroke, Homocysteine, Oxidative Stress.

28

29

30

31

32

33

34

1. Introduction

Acute ischemic stroke is the most common cerebrovascular disease and is one of the leading causes of death and long-term disability through the world (LU et al., 2018). With the increase in the aging population, stroke has become the disease with higher indices of global health charges, especially in low- and middle-income countries (GLOBAL BURDEN OF DISEASE, 2015). Among all Latin American countries, Brazil has the highest mortality due to stroke (LOTUFO, 2005).

Elevated plasma homocysteine levels have been indicated as an independent risk factor for ischemic stroke (LU et al., 2018; WU et al., 2016). Homocysteine is a sulfur amino acid, produced inside cells by demethylation of methionine (OIKONOMIDI, et al. 2016) and evidences have been reported that hiperhomocysteinemia (HHcy) is associated with many neurologic disorders including stroke, independent of long-recognized factors such as hyperlipidemia, hypertension and diabetes mellitus (MORETTI & CARUSO, 2019; LU et al., 2018; WU et al., 2016). HHcy is also related with functional disability in the acute phase of stroke and patients with acute stroke with elevated serum homocysteine levels are at an increase risk for early neurological deterioration (KWON et al., 2014).

HHcy may cause toxicity by a variety of mechanisms, which includes vascular endothelial injury, excitotoxicity via stimulation of N-methyl-D-aspartate receptors (NMDA), and increased production of reactive oxygen species (FARACI AND LENTZ 2004). The hypothesis of a possible association between elevated plasma levels of homocysteine and oxidative stress is corroborated by some studies indicating that cultivated endothelial cells with elevated levels of homocysteine may promote the formation of ROS, especially superoxide anion (WEISS, 2005). There are also reports that homocysteine causes significant disorders in the antioxidant defense system, for example in the enzymes glutathione peroxidase and superoxide dismutase (WEISS, 2005). A study performed *in vitro* with endothelial cells from human umbilical vein showed that homocysteine induces malondialdehyde (MDA) levels and inhibits eNOS (FENG et al., 2018), suggesting that HHcy can modify these oxidative stress biomarkers.

1 The literature on the level of homocysteine in patients with stroke is still
2 scarce as well as the understanding of its role in stroke pathophysiology. In
3 addition, to our knowledge, the relation between hyperhomocysteinemia and
4 oxidative stress has not been investigated in stroke to date. Thus, the objective
5 of this study was to evaluate oxidative and nitrosative stress in patients with
6 ischemic stroke with and without hyperhomocysteinemia. A second objective
7 was to verify whether hyperhomocysteinemia is associated with oxidative stress
8 in patients with ischemic stroke.

9 10 **2. Subjects and Methods**

11 12 ***Study participants and clinical data***

13
14 One hundred and seventy stroke patients and two hundred and twenty
15 control subjects from were recruited at the University Hospital of Londrina, State
16 University of Londrina.

17 Initially, the homocysteine levels of stroke patients and healthy controls
18 were compared. Next, stroke patients were divided into two groups of 85
19 patients, from the median, where values less than 13.59 were classified as
20 normal homocysteineemia and equal to or greater than ≥ 13.59 were classified
21 as patients with hyperhomocysteinemia.

22 Demographic data and metabolic biomarkers were analyzed in both
23 groups of stroke patients presenting normal homocysteinemia and
24 hyperhomocysteinemia.

25 Age, sex, ethnicity and body mass index (BMI) were assessed in all
26 groups. None of the patients was put on a specific diet or were receiving
27 antioxidant supplements.

28 None of the study participants had clinical or laboratory findings of
29 cardiac, thyroid, renal, hepatic, gastrointestinal or oncological diseases.
30 Patients with various conditions that could interfere with homocysteine values
31 such as renal insufficiency, vitamin B12 insufficiency, hypothyroidism, and
32 hemolysis or drug use, such as phenytoin, isoniazid, metotexate and L-dopa
33 (PANUNZIO et al., 2003) were excluded from the study..

1 All patients signed the informed consent form (annex), and the study
2 protocol was fully approved by the Ethics Committee of the State University of
3 Londrina, Paraná, Brazil under the number CAAE 0250.0.268.000-11.

4 5 ***Rankin's Scale***

6
7 The modified Rankin scale is the most prevalent functional outcome
8 measure in contemporary stroke research. The scale has seven levels, covering
9 the full range of functional outcomes from no symptoms to death
10 (BRODERICK, ADEOYE, ELM, 2017).

11 12 ***Anthropometric measurements, blood pressure and clinical data***

13
14 Body weight was measured to the nearest 0.1 kg by using an electronic
15 scale, with individuals wearing light clothing, but no shoes, in the morning;
16 height was measured to the nearest 0.1 cm by using a stadiometer. BMI was
17 calculated as weight (kg) divided by height (m) squared. The waist
18 circumference (WC) was measured with a tape in the region between the last
19 rib and the iliac crest, always in the standing position. Three blood pressure
20 measurements using a calibrated sphygmomanometer were taken with a 1-min
21 interval after the participant had been seated and were recorded on the left arm.
22 The mean of these measurements was used in the analysis. Neurological deficit
23 score was evaluated using the modified Rankin Scale (mRS) (BONITA AND
24 BEAGLEHOLE 1988) applied within eight hours of the admission (baseline) and
25 after three-month follow-up at the Neurology Outpatient Department of the
26 University of Londrina. The Rankin original scale is divided in six grades, where
27 zero corresponds to subjects with residual symptoms or light disability and
28 grade five are subjects with severe disability, confined to bed or in a wheel
29 chair. Thereafter, Rankin scale was modified with addition of death as the sixth
30 grade (ANDRÉ, 2006).

31 The outcome was assessed by clinical examination or using telephone
32 interviews with the patients or their relatives (OH et al., 2011; BABU et al.
33 2013). The mRS is commonly used for measuring the degree of disability or
34 dependence in the daily.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34

Biochemical biomarkers

After fasting for 12 hours, the subjects underwent the following laboratory blood analysis evaluated through a biochemical auto-analyzer (Dimension Dade AR Dade Behring, Deerfield, IL, USA) using Dade Behring® kits: total cholesterol, HDL cholesterol, LDL cholesterol, triacylglycerol (TG), and glucose. Plasma insulin level was determined by chemiluminescencemicroparticule immunoassay (Architect, Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA).

Tert-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence

Plasma levels of lipid hydroperoxide were evaluated by tertbutylhydroperoxide-initiated chemiluminescence (CL-LOOH) as described previously (GONZALEZ, LLESUY & BOVERIS, 1991), and the results were expressed in relative light units.

Determination of advanced oxidation protein products (AOPPs)

AOPPs were determined in the plasma using the semi-automated method described by Witko-Sarsat and cols. (WITKO-SARSAT, et al., 1996). AOPP concentrations were expressed as micromoles per liter ($\mu\text{mol/L}$) of chloramines-T equivalents.

Total radical-trapping antioxidant parameter

Total radical trapping antioxidant parameter (TRAP) was determined as reported by Repetto et al. This method detects hydrosoluble and/or liposoluble plasma antioxidants by measuring the chemiluminescence inhibition time induced by 2,2-azobis (2-amidinopropane). The system was calibrated with the vitamin E analogue Trolox.

Determination of nitric oxide metabolites

Serum levels of nitric oxide metabolites (NO_x) were assessed by nitrite (NO₂⁻) concentration according to the Griess reaction, supplemented by the reduction of nitrate to nitrite with cádmium (GUEVARA, et al., 1998 e NAVARRO-GONZÁLVEZ, GARCÍA-BENAYAS& ARENAS, 1998).

Determination of homocysteine

Plasma levels of homocysteine were determined by chemiluminescencemicroparticule immunoassay (Architect, Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA).

Statistical analysis

Categorical variables were evaluated using the chi-square test and the data were expressed in absolute number (%). To verify the distribution of the data, a Shapiro-Wilk normality test was used. To evaluate the homogeneity of the variances, a Levene test was used. Parametric data were evaluated by Test t of Student and were expressed as mean \pm Standard deviation (\pm SD). Non-parametric data were assessed by Mann-Whitney test and were expressed as median and interquartile range (25%-75%). Statistical difference was considered when $p < 0.05$. Binominal logistic regression was performed to determine associations. The variables that presented in the univariate analysis $p < 0.10$ were included in the binomial logistic regression analysis. Odds ratio and confidence interval were calculated. All statistical analyzes were performed using statistical software SPSS version 22.0 (IBM, USA).

Results

Serum homocysteine levels in patients with ischemic stroke and controls

Figure 1 shows the differences in homocysteine levels between healthy subjects (control group) and the group of patients with ischemic stroke. Patients

1 with stroke have higher levels of homocysteinemia than controls ($p < 0.001$)
2 when the results were adjusted for gender, ethnicity and age. The median of the
3 group of patients was 13.59 (25-75% interquartile: 9.73-17.47), whereas that of
4 the control was 11.46 (25-75% interquartile: 9.71-14.04).

6 ***Characteristics of patients according to the homocysteine levels***

8 Data from Table 1 show the demographic, clinical and laboratory
9 characteristics of the patients with stroke. The patients were divided according
10 to the median obtained in homocysteine levels: homocysteine < 13.59 , and with
11 hyperhomocysteinemia ≥ 13.59 . There were significant differences regarding
12 sex ($p = 0.001$), modified Rankin scale at the baseline ($p = 0.034$) and glucose
13 ($p = 0.020$).

15 ***Oxidative stress biomarkers according to the homocysteinemia levels***

17 Patients with ischemic stroke and hyperhomocysteinemia had a trend to
18 reduced NOx ($p = 0.071$) and increased TRAP ($p = 0.003$) levels when compared
19 to the patients without hyperhomocysteinemia (table 2).

21 ***Association of homocysteine levels with biological and oxidative stress markers***

24 After performing the binomial logistic regression analyses (Table 3), it
25 was verified that sex ($p = 0.032$), glucose ($p = 0.017$) and TRAP ($p = 0.019$) were
26 independently associated with hyperhomocysteinemia in patients with ischemic
27 stroke.

29 **Discussion**

31 The main findings of the present study were that increased TRAP, male
32 sex and decreased glucose levels were independently associated with
33 hyperhomocysteinemia in patients with ischemic stroke. In addition, this study

1 confirms that patients with ischemic stroke have higher homocysteine levels
2 than healthy subjects.

3 Recently, Anniwaer et al. (2018) showed the presence of
4 hyperhomocysteinemia in patients with primary cerebral infarction. Some
5 studies also revealed that patients with high homocysteine levels have
6 approximately 2 times higher stroke risk (Iso et al., 2004; Han et al., 2015).Of
7 note, besides being a risk factor, HHcy in stroke was associated with severity
8 and worse prognosis (Kwon et al., 2014) as well as with recurrence (Ye et al.,
9 2017; Gungor et al.,2018). The mechanisms by which HHcy is related to stroke
10 include direct toxicity, vascular endothelial injury, inhibition of N-methyl-D-
11 Aspartate receptors, and induction of oxidative stress (Moretti and Caruso,
12 2019). Furthermore, it has been reported that HHcy is related with both kinds
13 of stroke, ischemic and hemorrhagic, inducing cerebrovascular atherosclerosis
14 and atherothrombosis in the first case, and probably, in the second one by
15 upregulating the matrix metalloproteinases-9 (MMP-9) expression, which takes
16 responsibility for atherosclerotic plaque instability and rupture, and intracranial
17 hemorrhage incidence (Moretti and Caruso, 2019).

18 In relation to oxidative and nitrosative stress and homocysteine, our
19 results showed that patients with ischemic stroke and HHcy had a trend to
20 reduced NOx and increased TRAP levels when compared to the patients
21 without hyperhomocysteinemia. In addition, TRAP was independently
22 associated with HHcy in these patients. Other study also demonstrated a
23 decrease in NOx in stroke patients (Serrano - Ponz, et al., 2016). Evidences
24 showed that in response to higher Hcy levels, there is a decrease in NO level
25 (Sharma et al., 2015), which promotes endothelial damage (Hou et al., 2018).
26 HHcy-induced ROS production decreases NO production and bioavailability
27 triggering increased redox signaling, therefore HHcy may also be associated
28 with reduced plasma levels of NO and impaired endothelium-dependent
29 vasodilation (Moretti and Caruso, 2019; Hou et al., 2018).

30 The total plasma antioxidant capacity can also be related to HHcy. A
31 previous study demonstrated that antioxidants are markedly decreased in
32 stroke patients (CHERUBINI, et al., 2000). The study concluded that most
33 antioxidants evaluated were immediately reduced after stroke, possibly due to
34 the detriment of the oxidative stress present in the microenvironment

1 (CHERUBINI, et al., 2000). However, unexpectedly, our data showed the
2 opposite direction; TRAP was positively associated with HHcy, even without a
3 concomitant increase in lipid or protein oxidative stress markers.

4 Interestingly, sex has been shown to affect tHcy concentration (Yang et
5 al., 2014), and some previous studies reported a sex difference in the
6 relationship between homocysteine and risk of cardiovascular disease (Bertoia
7 et al., 2014; Zhong Et al., 2017). Our results showed that there were more male
8 patients in the HHcy group, and that sex was associated to HHcy,
9 independently of the possible confounding variables. Our findings are in
10 agreement with other studies which also reported higher levels of plasma
11 homocysteine in men than in women (Fukagama et al., 2000; Wang et al.,
12 2015). This result could be explained mainly by the differences in estradiol and
13 homocysteine metabolism pathway such as remethylation or transmethylation
14 (Zhong Et al., 2017; Fukagama et al., 2000). Blom et al. (1988) suggested that
15 a higher rate of methionine transamination in premenopausal women may
16 contribute to lower homocysteine concentrations and hence protect against
17 vascular disease, whereas Fukama et al. (2000) reported that changes rates of
18 remethylation and transmethylation were higher in women than in men after an
19 oral methionine load.

20 Some studies have shown that higher homocysteine levels are
21 associated with diabetes type 2, and that homocysteine level is worsened by
22 increasing insulin resistance, dyslipidemia and poor glucose control (Ala et al.,
23 2017). Differently from the literature, in this study the patients with
24 hyperhomocysteinemia had lower plasma glucose levels than reference group.
25 Our data also showed an inverse association between HHcy and glucose;
26 nevertheless, the majority of the patients of both group used hypoglycemic
27 agents what deeply limits the validity of this measurement.

28 Our present study has certain limitations. First, this cross-sectional study
29 does not allow inferences on causal relationships. Second, homocysteine level
30 is influenced by several factors which were not considered in this study, such as
31 dietary habits, folate and vitamin B12 levels, which may potentially cause bias.
32 Third, in the current study, the majority of the ischemic stroke patients had
33 moderate to severe disability (Rankin grade 4) with incapacity to walk and to

1 attend their physiologic needs without assistance. Therefore, our data and
2 association may be limited to ischemic stroke patients with this score.

3 In conclusion, this is the first study in which homocysteinemia and
4 oxidative and nitrosative stress markers were investigated in stroke patients.
5 HHcy were associated with male sex, decreased glucose and increased
6 TRAP. More studies are necessary to elucidate the complex relationship
7 between homocysteine and status redox in these patients.

8

9 **References**

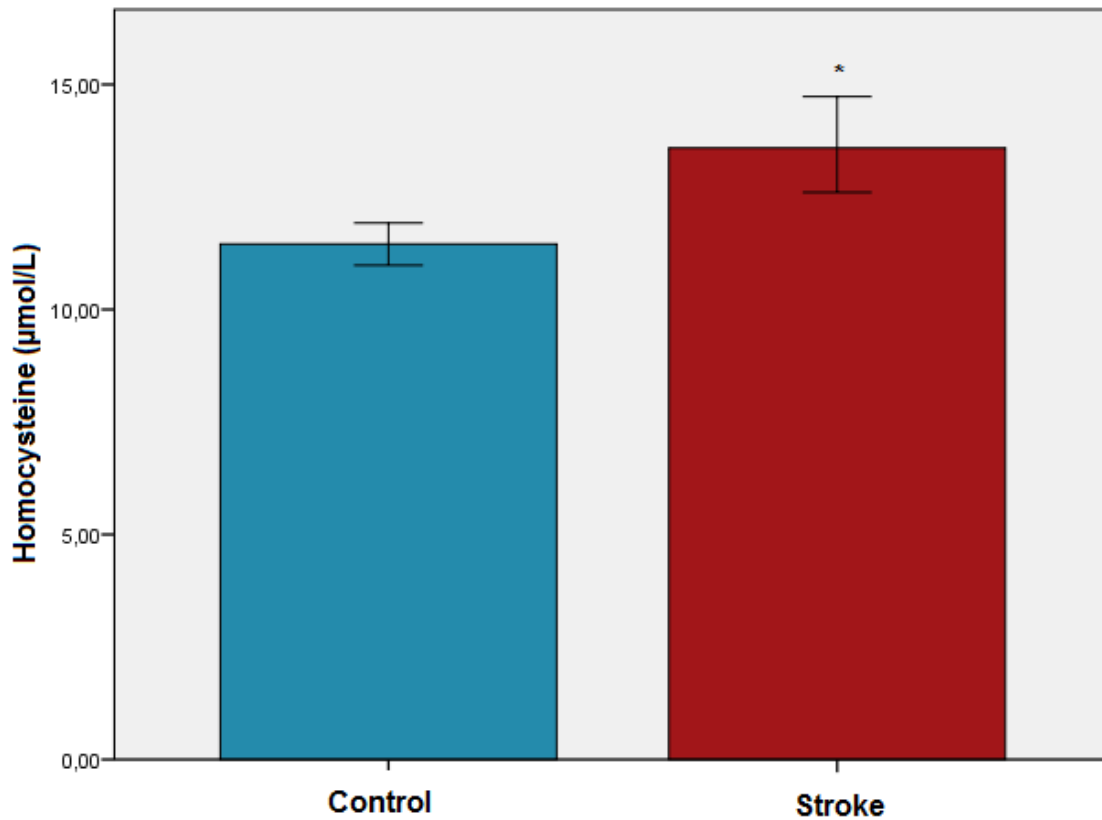
10

- 11 1. Ala OA, Akintunde AA, Ikem RT, Kolawole BA, Ala OO⁴, Adedeji TA.
12 Association between insulin resistance and
13 total plasma homocysteine levels in type 2 diabetes mellitus patients in
14 south west Nigria. *Diabetes MetabSyndr.* 2017 Dec;11 Suppl 2:S803-
15 S809.
- 16 2. André C. *Manual de AVC.* 2 ed. Rio de Janeiro: Revinter, 45p., 2006.
- 17 3. Anniwaer J,LiuM,Xue K, MaimaitiA,Xiamixiding A. Homocysteine Might
18 Increase the Risk of Recurrence in Patients Presenting with Primary
19 Cerebral Infarction.*Int J Neurosci.* 2018. Sep 14:1-16.
- 20 4. Babu MS, Kaul S, Dadheech S, Rajeshwar K, Jyothy A, Munshi A.
21 Serum albumin levels in ischemic stroke and its subtypes: correlation with
22 clinical outcome. *Nutrition* 29(6):872-5, 2013.
- 23 5. Bertoia ML, Pai JK, Cooke JP, JoostenMM, MittlemanMA, Rimm EB,
24 Mukamal KJ (2014) Plasma homocysteine, dietary B vitamins, betaine,
25 and choline and risk of peripheral artery disease. *Atherosclerosis*
26 235:94–101
- 27 6. Blom HJ, Boers G, van den Elzen J, van Roessel J, Trijbels J,
28 Tangerman A. Differences between premenopausal women and young
29 men in the transamination pathway of methionine catabolism, and the
30 protection against vascular disease. *Eur J Clin Invest* 1988;18:633–8.
- 31 7. Bonita R, Beaglehole R. Recovery of motor function after stroke. *Stroke*
32 19:1497–500, 1988.
- 33 8. Cherubini A, Polidori MC, Bregnocchi M, Pezzuto S, Cecchetti R, Ingegni
34 T, Di Iorio A, Senin U, Mecocci P. Antioxidant Profile and Early Outcome
35 in Stroke Patients. *Stroke.* 2000;31:2295-2300.
- 36 9. Faraci FM, Lentz SR (2004) Hyperhomocysteinemia, oxidative stress,
37 and cerebral vascular dysfunction. *Stroke* 35:345–347.
- 38 10. Feng PN, Liang YR, Lin WB, Yao ZR, Chen DB, Chen PS, Ouyang J.
39 Homocysteine induced oxidative stress in human umbilical vein
40 endothelial cells via regulating methylation of SORBS1. *Eur Rev Med*
41 *Pharmacol Sci.* 2018 Oct;22(20):6948-6958
- 42 11. Fukagawa NK, Martin JM, Wurthmann A, Prue AH, Ebenstein
43 D, O'Rourke B. Sex-
44 related differences in methionine metabolism and plasma homocysteine
45 concentrations. *Am J Clin Nutr.* 2000 Jul;72(1):22-9.

- 1 12. Global burden of disease study. Global, regional, and national incidence,
2 prevalence, and years lived with disability for 301 acute and chronic
3 diseases and injuries in 188 countries, 1990- 2013: a systematic analysis
4 for the Global Burden of Disease Study. *Lancet*. 2015. V. 386: 743–800.
- 5 13. Gonzalez Flecha B, Llesuy S & Boveris A (1991) Hydroperoxide-initiated
6 chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart,
7 liver, and muscle. *Free Radic Biol Med* 10, 93–100.
- 8 14. Guevara I, Iwanejko J, Dembin´ska-Kieć A, et al. (1998) Determination of
9 nitrite/nitrate in human biological material by the simple Griess reaction.
10 *Clin Chim Acta* 274, 177–188.
- 11 15. Gungor L, Polat M, Ozberk MB, Avci B, Abur U. Which Ischemic Stroke
12 Subtype is associated with hyperhomocysteinemia?
13 *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2018 Jul;27(7):1921-1929.
- 14 16. Han L, Wu Q, Wang C, et al. Homocysteine, ischemic stroke, and
15 coronary heart disease in hypertensive patients. A population-based,
16 prospective cohort study. *Stroke* 2015;46:1777-1786.
- 17 17. Hou HT, Wang J, Zhang X, Wang ZQ, Chen TN, Zhang JL, Yang Q, He
18 GW. Endothelial nitric oxide synthase enhancer AVE3085 reverses
19 endothelial dysfunction induced by homocysteine in human internal
20 mammary arteries. *Nitric Oxide*. 2018 Dec 1;81:21-27.
- 21 18. Iso H, Moriyama Y, Sato S, et al. Serum total homocysteine
22 concentrations and risk of stroke and its subtypes in Japanese. *Circ*
23 2004;109:2766-2772.
- 24 19. Kwon HM, Lee YS, Bae HJ, et al. Homocysteine as a predictor of early
25 neurological deterioration in acute ischemic stroke. *Stroke* 2014;45:871-
26 873.
- 27 20. Lotufo PA. Stroke in Brazil: a neglected disease. *São Paulo Med*. 2005. J.
28 123 (1): 3-4.
- 29 21. Lu SS, Xie J, Su CQ, Ge S, Shi HB, Hong
30 Xn. Plasma Homocysteine Levels And Intracranial Plaque Characteristics
31 : Association And Clinical relevance In Ischemic Stroke. *BMC*
32 *Neurol*. 2018 Dec 6;18(1):200.
- 33 22. Moretti R, Caruso P. The controversial role of homocysteine in neurology:
34 from labs to clinical practice. *Int J Mol Sci*. 2019 Jan 8;20(1). pii: E231.
- 35 23. Navarro-González JA, García-Benayas C & Arenas J (1998)
36 Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids. *Clin Chem* 44,
37 679–681.
- 38 24. Oh MS, Yu KH, Chu MK, Ma HI, Kim YJ, Kim JY, Lee BC, Mi SO, Kyung-
39 Ho Y, Min-Kyung C, Hyeo-II M, Yun JK, Joo YK, Byung-Chul L. Long-
40 term prognosis of symptomatic isolated middle cerebral artery disease in
41 Korean stroke patients. *BMC Neurology*, 2011.
- 42 25. Oikonomidi A, Lewczuk P, Kornhuber J, Smulders Y, Linnebank
43 M, Semmler A, Popp J. Homocysteine metabolism is associated with
44 cerebrospinal fluid levels of soluble amyloid precursor protein and
45 amyloid beta. *J Neurochem*. 2016. Oct;139(2):324-332.
- 46 26. Panunzio MF, Pisano A, Antoniciello A et al. (2003) Supplementation
47 with fruit and vegetable concentrate decreases plasma homocysteine
48 levels in a dietary controlled trial. *Nutr Res* 23, 1221-1228
- 49 27. Repetto M, Reides C, Gomez Carretero ML, Costa M, Griemberg G,
50 Llesuy S. Oxidative stress in blood of HIV infected patients. *Clin Chim*

- 1 Acta. 1996;255:107-17.
- 2 28. Serrano-Ponz M, Rodrigo-Gasqué C, Siles E, Martínez-Lara E, Ochoa-
3 Callejero L, Martínez A. Temporal profiles of blood pressure, circulating
4 nitric oxide, and adrenomedullin as predictors of clinical outcome in acute
5 ischemic stroke patients. *Molecular Medicine Reports* 13: 3724-3734
6 2016.
- 7 29. Sharma, M.; Tiwari, M.; Tiwari, R.K. Hyperhomocysteinemia: Impact on
8 neurodegenerative diseases. *Basic Clin. Pharmacol. Aand. Toxicol.*
9 2015, 117, 287–296.
- 10 30. Venturini D, Simão ANC, Sripes NA, et al. (2012) Evaluation of
11 oxidative stress in overweight subjects with or without metabolic
12 syndrome. *Obesity* 20, 2361–2366
- 13 31. Wang C, Han L, Wu Q et al. (2015) Association between homocysteine
14 and incidence of ischemic stroke in subjects with essential hypertension:
15 a matched case-control study. *Clinical and experimental hypertension*
16 (New York, NY: 1993):1–6
- 17 32. Weiss N. Mechanisms of increased vascular oxidant stress in
18 hyperhomocysteinemia and its impact on endothelial function. *Curr Drug*
19 *Metab.* 2005. 6(1):27-36.
- 20 33. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillère-Blandin C, NguyenKhoa T,
21 Nguyen AT, Zingraff J, et al. Advanced oxidation protein products as a
22 novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int*, 49:1304-13, 1996.
- 23 34. Wu W, Guan Y, Xu K, Fu XJ, Lei XF, Lei LJ, et al. Plasma homocysteine
24 levels predict the risk of acute cerebral infarction in patients with carotid
25 artery lesions. *MolNeurobiol.* 2016;53:2510–7.
- 26 35. Yang B, Fan S, Zhi X, Wang Y, Wang Y, Zheng Q, Sun G (2014)
27 Prevalence of hyperhomocysteinemia in China: a systematic review and
28 meta-analysis. *Nutrients* 7:74–90
- 29 36. Ye Z, Zhang Z, Zhang H, et al. Prognostic value of C-reactive protein and
30 homocysteine in large-artery atherosclerotic stroke: a prospective
31 observational study. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2017;26:618-626.
- 32 37. Zhong C, Xu T, Xu T, Peng Y, Wang A, Wang J, Peng H, Li Q, Geng
33 D, Zhang D, Zhang Y, Zhang Y, Gao X, He J; CATIS Investigation
34 Groups. Plasma Homocysteine and Prognosis of Acute Ischemic Stroke:
35 a Gender
36 Specific Analysis From CATIS Randomized Clinical Trial. *MolNeurobiol.* 2
37 017 Apr;54(3):2022-2030.

1



2

3

4

5

6

7

Figure1. Patients with ischemic stroke showed higher plasma levels of homocysteine (median: 13.59, 25-75% interquartile: 9.73-17.47) than control group (median: 11.46, 25-75% interquartile: 9.71-14.04). Mann-Whitney test. * $p < 0.001$ adjusted by sex, ethnicity and age.

1 **Table 1.**Demografic characteristics and metabolic biomarkers according homocysteine levels in patients with ischemic stroke.
2

Parameters	Referencegroup (n=85)	Hyperhomocysteinemia (n=85)	p
Age (years)	68 (60-77)	71 (56-77)	0.899
Female/Male (%)	46 (54.1)/39 (45.9)	25 (29.4)/60 (70.6)	0.001
Caucasian/NotCaucasian (%)	68 (80.0)/17 (20.0)	64 (75.2)/21 (24.8)	0.461
Antihypertensive (N/Y) (%)	68 (80.8)/16 (19.1)	55 (73.3)/20 (26.7)	0.252
Hypoglycemicagents (N/Y) (%)	27 (32.9)/55 (67.1)	18 (24.3)/56 (75.7)	0.236
Hypolipidemicagents (N/Y) (%)	28 (34.1)/54 (65.9)	20 (27.0)/54 (73.0)	0.336
Smoker (N/Y) (%)	15 (17.6)/79 (82.4)	22 (27.5)/58 (72.5)	0.129
MetS (N/Y) (%)	36 (42.3)/49 (57.7)	25 (30.4)/57 (69.6)	0.111
Hypertension (N/Y) (%)	73 (85.8)/12 (14.2)	64 (78.0)/18 (22.0)	0.187
Strokeprevious(N/Y) (%)	30 (36.1)/53 (63.9)	35 (42.6)/47 (57.4)	0.390
Rankin (Baseline)	4 (3-5)	4 (2-4)	0.034
Rankin (After3Months)	4 (2-6)	4 (2-6)	0.413
Body mass index (Kg/M ²)	26.00 (5.72)	26.57 (5.15)	0.467
SBP	147 (120-160)	150(129-170)	0.300
DBP	85 (80-100)	90 (80-100)	0.703
Total cholesterol (mg/dL)	179 (53)	170 (49)	0.323
LDL-C (mg/dL)	102 (80-129)	129 (98-74)	0.450

Table 1. Demografic characteristics and metabolic biomarkers according homocysteine levels in patients with ischemic stroke.

HDL-C (mg/dL)	43 (17)	42 (14)	0.806
Triglycerides(mg/dl)	137 (98)	129 (85)	0.732
Glucose (mg/dl)	129 (105-207)	117 (98-148)	0.020
Insulin (µU/ml)	27.22 (40.30)	25.49 (33.93)	0.660

1 Qui-square test. Data are expressed as absolute number (%). Teste t de Student. Data are expressed as media (\pm SD). Teste de
 2 Mann-Whitney. Data are expressed as median (25%-75%). F: Female; M: male; C: Caucasian; NC: not Caucasian; N: No; Y:Yes;
 3 MetS: Metabolic Syndrome; PAS: Sistolic arterial pressure; PAD: diastolic blood pressure; LDL-C: low density lipoprotein; HDL-C:
 4 High density lipoprotein. Reference Group: Homocysteine <13.59 and hyperhomocysteinemia \geq 13.59.

5

1 **Table 2.Oxidative stress biomarkers according homocysteine levels in patients with ischemic stroke.**

2

Parameters	Referencegroup n=85	Hyperhomocysteinemia n=85	p
AOPP (μmol/Lof chloramine T equivalents)#	149 (116-220)	189 (120-259)	0.153
NOx (μmol/L)#	18.32 (11,90-22,80)	14.91 (9.78-19.54)	0.071
LOOH (cpm)#	20417.50 (14933.0-29389.0)	21105 (16266.0-30074.0)	0.482
TRAP (μMofTrolox)	759 (162)	839 (188)	0.003

3

4

5

6

7

8

9

Teste t de Student. Data are expressed as media (\pm SD). Teste de Mann-Whitney. Data are expressed as median (25%-75%).AOPP:advanced oxidation protein products; NOx: Nitric oxide metabolites; LOOH: Lipid hydroperoxide; TRAP: Total radical trapping antioxidant parameter. Reference group: Homocysteine<13.59. Hyperhomocysteine \geq 13.59.cpm: flicker per minute.
Data evaluated by Ln

1 **Table 3. Binomial logistic regression analysis in ischemic stroke patients according to the homocysteine levels**
 2 **(homocysteine <13.59 as reference group) and explanatory variables**

Parameters	B	S.E.	Wald	OddsRatio (IC 95%)	p
Female/Male	0.902	0.421	4.584	2.464 (1.079-5.623)	0.032
Rankin (Baseline)	-0.013	0.156	0.007	0.987 (0.728-1.340)	0.935
Glucose (mg/dl)	-0.009	0.004	5.698	0.991 (0.984-0.998)	0.017
TRAP(μMofTrolox)	0.003	0.001	5.519	1.003 (1.000-1.005)	0.019
NOx(μmol/L)	-0.016	0.022	0.523	0.984 (0.943-1.028)	0.469

3 Data are expressed as absolute number. Teste t de Student. Data are expressed as media (\pm SD). Teste de Mann-Whitney.

4 Data are expressed as median (25%-75%). NO: Nitric oxide; TRAP: Total radical trapping antioxidant parameter.

5 Referencegroup: Homocysteine<13.59. Hyperhomocysteinemia \geq 13.59.

6. CONCLUSÕES

Em conclusão, este é o primeiro estudo em que homocisteinemia e marcadores de estresse oxidativo e nitrosativo foram investigados em pacientes com AVC. Os pacientes com AVE apresentam níveis séricos aumentados de homocisteína sérica em relação aos controles. Homocisteinemia tem maior prevalência em pacientes do sexo masculino no grupo de pacientes com hiperhomocisteinemia. Pacientes com homocisteinemia apresentam menor escore na escala de Rankin modificada. Glicose está menor em pacientes com hiperhomocisteína sérica. TRAP está aumentado em pacientes com hiperhomocisteinemia. Glicose, sexo e TRAP são independentemente associados à hiperhomocisteinemia. Mais estudos são necessários para elucidar a complexa relação entre homocisteína e status redox nesses pacientes.

Finalmente, contemplando o artigo 1, podemos afirmar que embora os estudos patofisiológicos sobre a função desempenhada pelo estresse oxidativo no AVE tenham ajudado na compreensão desse importante mecanismo, os trabalhos sobre o papel que poderia ser desempenhado pela intervenção com antioxidantes, embora promissores, ainda são incipientes. Mais estudos são necessários para descortinar esse amplo caminho que se abre na perspectiva de atenuar os sinais e sintomas dessa grave doença.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo apresenta certas limitações. Primeiro este estudo transversal não permite inferências sobre relações causais. Segundo, o nível de homocisteína é influenciado por vários fatores que não foram considerados neste estudo, como hábitos alimentares, folato e níveis de vitamina B12, que podem potencialmente causar viés. Terceiro, no presente estudo, a maioria dos pacientes com AVC isquêmico apresentava incapacidade moderada a grave (grau 4) com incapacidade de andar e atender suas necessidades fisiológicas sem assistência. Portanto, nossos dados e associação podem ser limitados a pacientes com AVC isquêmico com esse escore.

8. REFERENCIAS

- 1
2
3 1. Abramov AY, Scorziello A, Duchen MR. Three distinct mechanisms
4 generate oxygen free radicals in neurons and contribute to cell death
5 during anoxia and reoxygenation. *J. Neurosci.* 2007. 27, 1129–1138.
- 6 2. Alfieri DF, Lehmann MF, Oliveira SR, Flauzino T, Delongui F, de Araújo
7 MCM, et al. Vitamin D deficiency is associated with acute ischemic
8 stroke, C-reactive protein, and short-term outcome.
9 *MetabolicBrainDisease.* 2017. V. 32: 493-502.
- 10 3. Allen CL, Bayraktutan U. Oxidative stress and its role in the pathogenesis
11 of ischaemic stroke. *Int. J. Stroke.* 2009. V. 4: 461-470.
- 12 4. Anniwaer J, Liu M, Xue K, Maimaiti A, Xiamixiding A. Homocysteine Might
13 Increase the Risk of Recurrence in Patients Presenting with Primary
14 Cerebral Infarction. *Int J Neurosci.* 2018. Sep 14:1-16.
- 15 5. Barrachina MD, Panés J, Esplugues JV. Role of Nitric Oxide in
16 Gastrointestinal Inflammatory and Ulcerative Diseases: Perspective for
17 Drugs Development. *CurrentPharmaceutical Design.* 2001. V. 7:31-48.
- 18 6. Baynes JW, Dominiczak MH. *Medical Biochemistry.* Elsevier Mosby.
19 Philadelphia, USA. 2005. p. 693.
- 20 7. Bensenor IM, Goulart AC, Szwarcwald CL, Vieira MLFP, Malta DC,
21 Lotufo PA. Prevalence of stroke and associated disability in Brazil:
22 National Health Survey – 2013. *Neuropsiquiatr* 2015. V. 73(9): 746-750.
- 23 8. Brasil. Ministério da Saúde 2014. Acidente Vascular Cerebral (AVC).
24 Disponível em <<http://www.brasil.gov.br/saude/2012/04/acidente-vascular-cerebral-avc>>. Acesso em: 22 de novembro de 2017.
- 25
26 9. Brigelius-Flohe R, Kipp A. Glutathione peroxidases in different stages of
27 carcinogenesis. *BiochimBiophys Acta.* 2009. V. 1790:1555–68.
- 28 10. Campos EBP, Yoshida WB. O papel dos radicais livres na fisiopatologia
29 da isquemia e reperfusão em retalhos cutâneos: modelos experimentais
30 e estratégias de tratamento. *Jornal Vascular Brasileiro.* 2004. V. 3(4):
31 357-366.
- 32 11. Cao W, Hou FF, Nie J. AOPPs and the progression of kidney disease.
33 *Kidney Int. Suppl.* 2014. V. 4:102-106.

- 1 12. Cesário CMM, Penasso P, Oliveira APR. Impacto da disfunção motora
2 na qualidade de vida em pacientes com Acidente Vascular Encefálico.
3 Revista Neurociências. 2006. V. 14(1): 6-9.
- 4 13. Chaves MLF. Acidente vascular encefálico: conceituação e fatores de
5 risco. RevBrasHipertensvol 7(4): outubro/dezembro de 2000.
- 6 14. Chen H, Yoshioka H, Kim GS, Jung JE, Okami N, Sakata H, *et al.*
7 Oxidative stress in ischemic brain damage: mechanisms of cell death
8 and potential molecular targets for neuroprotection. Antioxid. Redox
9 Signal. 2011. V. 14: 1505–1517.
- 10 15. Chen J, SHEN NA, DUAN X, GUO Y. An investigation of the mechanism
11 of dexmedetomidine in improving postoperative cognitive dysfunction
12 from the perspectives of alleviating neuronal mitochondrial membrane
13 oxidative stress and electrophysiological dysfunction experimental and
14 therapeutic medicine. 2018. V. 15: 2037-2043.
- 15 16. Chukwuma CS, Tuomilehto J. Diabetes and the risk of stroke. J Diabetes
16 Complications. 1993. 7: 250-62.
- 17 17. Circu ML, Aw TY. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and
18 apoptosis. FreeRadic. Biol. Med. 2010. V. 48(6): 749–762.
- 19 18. Costa LA, Rodrigues VP, Guerreiro RN, Silva-Costa DL, CâmaraMAR,
20 Santos, NTP, Santos WS, Trindade GP, Reis Junior SH. Índice de
21 hospitalização por acidente vascular encefálico em um hospital público
22 no norte do Brasil. ArqBrasNeurocir 2018; 37(S 01): S1-S332.
- 23 19. Crack PJ, Taylor JM. Reactive oxygen species and the modulation of
24 stroke. FreeRadicBiol Med. 2005. V. 38: 1433–1444.
- 25 20. Daia Y, Zhangb H, Zhanga J, Yanc M. Isoquercetin attenuates oxidative
26 stress and neuronal apoptosis after ischemia/reperfusion injury via Nrf2-
27 mediated inhibition of the NOX4/ ROS/NF-κB pathway. Chemic-
28 BiologicalInteractions. 2018. V. 284: 32–40.
- 29 21. De Silva TM, Brait VH, Drummond GR, Sobey CG, Miller AA. Nox2
30 oxidase activity accounts for the oxidative stress and vasomotor
31 dysfunction in mouse cerebral arteries following ischemic stroke. PLoS
32 ONE 2011, 6, e28393.

- 1 22. Deb P, Hassan SSKM. Pathophysiologic mechanisms of acute ischemic
2 stroke: An overview with emphasis on therapeutic significance beyond
3 thrombolysis. *Pathophysiology*. 2010. 17:197–218.
- 4 23. Elkind MS, Sacco RL. Stroke risk factors and stroke prevention.
5 *SeminNeurol* 18: 419-40, 1998.
- 6 24. Evora PRB, Pearson PJ, Seccombe JF, Schaff HV. Atualização: Lesão
7 de isquemia e reperfusão. Aspectos fisiopatológicos e a importância da
8 função endotelial. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 1996. V. 4 (66):
9 239.
- 10 25. Faeh D, Chiolero A, Paccaud F. Homocysteine as a risk factor for
11 cardiovascular disease: should we (still) worry about it? *SwissMedWkly*.
12 2006. 136:745–56.
- 13 26. Fanaeia H, Karimianb SM, Sadeghipourb HR, Hassanzadec G,
14 Kasaeiane A, Attarid F, et al. Testosterone enhances functional recovery
15 after stroke through promotion of antioxidant defenses, BDNF levels and
16 neurogenesis in male rats. *BrainResearch*. 2014. V. 1558: 74–83.
- 17 27. Fernando G, Yamila R, Cesar GJ, Ramón R. Neuroprotective Effects of
18 neuroEPO Using an In Vitro Model of Stroke. *Behav. Sci*. 2018. V. 8: 26.
- 19 28. Fernando G, Yamila R, Cesar GJ, Ramón R. Neuroprotective Effects of
20 neuroEPO Using an In Vitro Model of Stroke. *Behav. Sci*. 2018. V. 8: 26.
- 21 29. Ferrari CKB, França EL, Honorio-França AC. Nitric oxide, health and
22 disease. *J Appl Biomed*. 2009. V 7: 163–173.
- 23 30. Ferrari R, Ceconi C, Curello S, Alfieri O, Visioli O. Myocardial damage
24 during ischaemia and reperfusion. *European Heart Journal*, London.
25 1993. V. 14: 25-30.
- 26 31. Ganguly P, Alam SF. Role of homocysteine in the development of
27 cardiovascular disease. *NutritionJournal* 2015, 14:6.
- 28 32. Garófolo L, Barros JrN, Ferreira SR, Sanudo A, Miranda JrF. Moderate
29 hyperhomocysteinemia in atherosclerotic peripheral arterial disease in
30 the diabetics Nipo-Brazilian population in the city of Bauru. *J Vasc Bras*.
31 2003. 2(suppl 1):S82.
- 32 33. Garry PS, Ezra A, Rowland MJ, Westbrook J, Pattinson KTS. The role of
33 the nitric oxide pathway in brain injury and its treatment — From bench to
34 bedside. *Experimental Neurology*. 2015. V. 263: 235–243.

- 1 34. Global burden of disease study. Global, regional, and national incidence,
2 prevalence, and years lived with disability for 301 acute and chronic
3 diseases and injuries in 188 countries, 1990- 2013: a systematic analysis
4 for the Global Burden of Disease Study. *Lancet*. 2015. V. 386: 743–800.
- 5 35. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radical in Biology and Medicine*, 3rd
6 ed., Oxford University Press: Oxford, 2002; 4th ed., 2007.
- 7 36. Hankey GJ, Eikelboom JW. Homocysteine and vascular disease. *Lancet*.
8 1999. 354:407–13.
- 9 37. Hankey GJ. B vitamins for stroke prevention. *Stroke and Vascular
10 Neurology*. 2018. 3: e000156.
- 11 38. Harboe-Gonçalves L, Vaz LS, Buzzi M. Associação entre níveis
12 plasmáticos de homocisteína e acidente vascular cerebral isquêmico:
13 Estudo transversal analítico. *ArqNeuropsiquiatr*. 2005. 63(1):97.
- 14 39. Harvey RA, Ferrier DR. In: Rhyner S, editor. *Lippincott's Illustrated
15 Reviews, Biochemistry*. 5th ed. Philadelphia: WoltersKluwer Health.
16 2011. p. 264–5.
- 17 40. Hertz L. Bioenergetics of cerebral ischemia: a cellular perspective.
18 *Neuropharmacology*. 2008. 55, 289–309
- 19 41. Hossmann KA. Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia.
20 *Ann Neurol*. 1994. 36:557–65.
- 21 42. Huang X, Li Y, Li P, Li J, Bao H, Zhang Y, Wang B, Sun N, Wang J, He
22 M, Yin D, Tang G, Chen Y, Cui Y, Huang Y, Hou FF, Qin X, Huo
23 Y, Cheng X. Association between percent decline in serum
24 total homocysteine and risk of first stroke. *Neurology*. 2017.
25 Nov14;89(20):2101-2107.
- 26 43. Jauch EC, Saver JL, Adams HP Jr, Bruno A, Connors JJ, Demaerschalk
27 BM, et al. Guidelines for the Early Management of Patients With Acute
28 Ischemic Stroke: A Guideline for Healthcare Professionals From the
29 American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*. 2013.
30 V. 44(3): 870-947.
- 31 44. Jiao Y, Wang Y, Guo S, Wang G. Glutathione peroxidases as
32 oncotargets. *Oncotarget*. 2017. V. 3; 8(45): 80093–80102.

- 1 45. Jung T, Hohn A, Grune T. The proteasome and the degradation of
2 oxidized proteins: Part II—Protein oxidation and proteasomal
3 degradation. *Redox Biol.* 2014. V. 2: 99–104.
- 4 46. Kahles T, Brandes RP. Which NADPH oxidase isoform is relevant for
5 ischemic stroke? The case for nox 2. *Antioxid. Redox Signal.* 2013.
6 V. 18: 1400-1417.
- 7 47. Kalani A, Kamat PK, Givvimani S, Brown K., Metreveli N, Tyagi SC,
8 Tyagi N. Nutri-epigenetics ameliorates blood–brain barrier damage and
9 neurodegeneration in hyperhomocysteinemia: Role of folic acid. *Journal of*
10 *Molecular Neuroscience: MN.* 2014. 52(2), 202–215.
- 11 48. Kanda A, Noda K, Ishida S. ATP6AP2/(pro)renin receptor contributes to
12 glucose metabolism via stabilizing the pyruvate dehydrogenase
13 E1_{subunit}. *J. Biol. Chem.* 2015, 290, 9690–9700.
- 14 49. Karaszewski B, Wardlaw JM, Marshall I, Cvorovic V, Wartolowska K, Haga
15 K, Armitage PA, Bastin ME, Dennis MS. Early brain temperature
16 elevation and anaerobic metabolism in human acute ischaemic stroke,
17 *Brain.* 2009. 132:955–964.
- 18 50. Karenberg A, Hort I. Medieval descriptions and doctrines of stroke:
19 Preliminary analysis of select sources. Part II: Between galenism and
20 aristotelism – Islamic theories of apoplexy (800-1200) *J*
21 *HistNeurosci.* 1998;7:174–85.
- 22 51. Kotur-Stevuljevic J, Bogavac-Stanojevic N, Jelic-Ivanovic Z, Stefanovic
23 A, Gojkovic T, et al. Oxidative stress and paraoxonase 1 status in acute
24 ischemic stroke patients. *Atherosclerosis.* 2015. V. 241: 192-198.
- 25 52. Kumar M, Tyagi N, Moshal K S, Sen U, Pushpakumar SB, Vacek T,
26 Tyagi SC. GABAA receptor agonist mitigates homo-cysteine-induced
27 cerebrovascular remodeling in knockout mice. *Brain Research.* 2008.
28 1221, 147–153.
- 29 53. Kunz A, Dirnagl U, Mergenthaler P. Acute pathophysiological processes
30 after ischaemic and traumatic brain injury. *Best*
31 *Practice & Research Clinical Anaesthesiology.* 2010. V. 24: 495-509.
- 32 54. Lewerenz J, Dargusch R, Maher P.
33 Lactacidosis modulates glutathione metabolism and oxidative glutamate toxic-
34 ity. *J. Neurochem.* 2010. 113, 502–514.

- 1 55. Liao D, Myers R, Hunt S et al. Familial history of stroke and stroke risk.
2 The Family Heart Study. *Stroke*. 1997. 28:1908- 12.
- 3 56. Liu S, Shi H, Liu W, Furuichi T, Timmins GS, Liu KJ. Interstitial pO₂ in
4 ischemic penumbra and core are differentially affected following transient
5 focal cerebral ischemia in rats. *J. Cereb. BloodFlowMetab.* 2004. 24,
6 343–349.
- 7 57. Loscalzo J, Handy DE. Epigenetic modifications: basic mechanisms and
8 role in cardiovascular disease (2013 Grover Conference Series). *Pulm*
9 *Circ.* 2014. 4(2):169–74.
- 10 58. Lotufo PA. Stroke in Brazil: a neglected disease. *São Paulo Med.* 2005. J.
11 123 (1): 3-4.
- 12 59. Ma MW, Wang J, Zhang Q, Wang R, Dhandapani KM, Vadlamudi RK,
13 Brann DW. NADPH oxidase in brain injury and neurodegenerative
14 disorders. *Mol. Neurodegener.* 2017, 12, 7.
- 15 60. Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS. Oxidative stress and vascular
16 disease. *ArteriosclerThrombVasc Biol.* 2005. V. 25: 29–38.
- 17 61. Maneen MJ, Hannah R, Vitullo R, DeLance N, Cipolla MJ. Peroxynitrite
18 diminishes myogenic activity and is associated with decreased vascular
19 smooth muscle F-actin in rat posterior cerebral arteries. *Stroke*. 2006. V.
20 37:894–899.
- 21 62. Manzanero S, Santro T, Arumugam TV. Neuronal oxidative stress in
22 acute ischemic stroke: sources and contribution to cell injury.
23 *Neurochem. Int.* 2013. V. 62 (5): 712–718.
- 24 63. Marletta MA, Hursham AR, Rusche RM. Catalysis by nitric oxide
25 synthase. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 1997. V. 2: 646-663.
- 26 64. Maury IP, Alves M, Fonseca T. Neurosyphilis prevalence at a Portuguese
27 stroke unit care. *Aging Clinical and Experimental Research*, 2018.
- 28 65. Mendes KDS, Silveira RCCP, Galvão CM. Revisão integrativa: método
29 de pesquisa para a incorporação de evidências na saúde e na
30 enfermagem. *Texto Contexto Enferm.* 2008. V. 17(4): 758-64.
- 31 66. Moro MA, Almeida A, Bolanos JP, Lizasoain I. Mitochondrial respiratory
32 chain and free radical generation in stroke. *FreeRadic. Biol. Med.* 2005.
33 V. 39 (10): 1291–1304.

- 1 67. Mudd SH, Finkelstein JD, Refsum H, Ueland PM, Malinow MR, Lentz
2 SR, et al. Homocysteine and its disulfide derivatives: a suggested
3 consensus terminology. *ArteriosclerThrombVasc Biol.* 2000. 20:1704-6.
- 4 68. Munther I, Aldoori MI, Rahman SH Smoking and stroke: a causative role
5 – Heavy smokers with hypertension benefit most from stopping. *BMJ.*
6 1998. 317: 962-3.
- 7 69. Murray CJL, Lopez AD. Mortality by cause for eight regions of the world:
8 global burden of disease study. *Lancet* 349: 1269-76, 1997.
- 9 70. Nakanishi N, Tu S, Shin Y, Cui J, Kurokawa T, Zhang D, Chen HS, Tong
10 G, Lipton AS. Neuroprotection by the NR3A subunit of the NMDA
11 receptor, *J. Neurosci.* 2009. 29:5260– 5265.
- 12 71. Nanetti LR, Taffi R, Vignini A. Reactive oxygen species plasmatic levels in
13 ischemic stroke. *Mol. Cell. Biochem.* 2007. V. 303: 19-35.
- 14 72. Nasrallah MM, El-Shehaby AR, Osman NA, Fayad T, Nassef A, Salem
15 MM, Sharaf EDU. The association between fibroblast growth factor-23
16 and vascular calcification is mitigated by inflammation markers. *Nephron*
17 *Extra.* 2013. V. 3: 106-112.
- 18 73. Nath N, Prasad HK, Kumar M. Cerebroprotective effects of hydrogen
19 sulfide in homocysteine-induced neurovascular permeability: Involvement
20 of oxidative stress, arginase, and matrix metalloproteinase-9. *J*
21 *CellPhysiol.* 2018. 1–13.
- 22 74. Nomani AZ, Nabi S, Badshah M, et al. Review of acute ischaemic stroke
23 in Pakistan: progress in management and future perspectives. *Stroke*
24 *and Vascular Neurology* 2017;2.
- 25 75. Oikonomidi A, Lewczuk P, Kornhuber J, Smulders Y, Linnebank
26 M, Semmler A, Popp J. Homocysteine metabolism is associated with
27 cerebrospinal fluid levels of soluble amyloid precursor protein and
28 amyloid beta. *J Neurochem.* 2016. Oct;139(2):324-332.
- 29 76. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health
30 and disease. *Physiol. Rer.* 2007. V. 87:315-424.
- 31 77. Perry IJ. Homocysteine and risk of stroke. *J CardiovascRisk.* 1999.
32 6:235-40.
- 33 78. Pessini L. Bioética em tempos de globalização. São Paulo: Loyola, 2015.

- 1 79. Pickering AM, Linder RA, Zhang H, Forman HJ, Davies KJ. Nrf2-
2 dependent induction of proteasome and Pa28 regulator are required for
3 adaptation to oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 2012. V. 287:10021–10031.
- 4 80. Pogessi A, Pasi M, Pescini F, Pantoni L, Inzitari D. Circulating biologic
5 markers of endothelial dysfunction in cerebral small vessel disease: a
6 review. *J CerebBloodFlowMetab.* 2016. V. 36: 72–94.
- 7 81. Radermacher KA, Wingler K, Kleikers P, AltenhöferSjr. Hermans J,
8 Kleinschnitz C,
- 9 82. Sacco RL, Wolf PA, Gorelick PB. Risk factors and their management for
10 stroke prevention: outlook for 1999 and beyond. *Neurology.* 1999. 53:
11 S15-24.
- 12 83. Sachdev P. Homocisteína e transtornos psiquiátricos. *Rev. Bras.*
13 *Psiquiatria.* 2004. 26(1):50-6.
- 14 84. Schmidt HHHW. The 1027th target candidate in stroke: Will NADPH
15 oxidase hold up? *Exp. Transl. Stroke Med.* 2012, 4, 11.
- 16 85. Sims NR, Anderson MF. Mitochondrial contributions to tissue damage in
17 stroke. *Neurochem. Int.* 2002. V. 40 (6): 511–526.
- 18 86. Small DL, Morley P, Buchan AM. Biology of ischemic cerebral cell death.
19 *ProgCardiovascDis.* 1999. V.42:185-207.
- 20 87. Sommer CJ. Ischemic stroke: experimental models and reality. *Acta*
21 *Neuropathol.* 2017. V.133: 245-261.
- 22 88. Sorby-Adams AJ, Marcoionni AM, Dempsey ER, Woenig JÁ, Turner RJ.
23 The role of neurogenic inflammation in blood-brain barrier disruption and
24 development of cerebral oedema following acute central nervous system
25 (CNS) Injury. *Int. J. Mol. Sci.* 2017, 18, 1788.
- 26 89. Sorce S, Stocker R, Seredenina T, Holmdahl R, Aguzzi A, Chio A,
27 Depaulis A, Heitz F, Olofsson P, Olsson T. NADPH oxidases as drug
28 targets and biomarkers in neurodegenerative diseases: What is the
29 evidence? *FreeRadic. Biol. Med.* 2017, 112, 387–396.
- 30 90. Taffi R, Nanetti L, Mazzanti M, Bartolini A, Vignini F, Raffaelli P. et al.
31 Plasma levels of nitric oxide and stroke outcome. *J Neurol.* 2008. V.
32 255:94–98.

- 1 91. Tardini DMS, Yoshida WB. Lesões cerebrais decorrentes de isquemia e
2 reperfusão na cirurgia de endarterectomia de carótida. *Jornal Vascular*
3 *Brasileiro*. 2003. V. 2(2): 119-28.
- 4 92. Thorvaldsen P, Asplund K, Kuulasmaa K, Rajakangas A, Schroll M.
5 Stroke incidence, case fatality and mortality in the WHO MONICA
6 project. *Stroke*. 1995. 26:361-7.
- 7 93. Tsai CF, Thomas B, Sudlow CL. Epidemiology of stroke and its sub-
8 types in Chinese vs white populations: a systematic review. *Neurology*.
9 2013. V. 81: 264–72.
- 10 94. Tsai N, Chang Y, Huang C, Lin Y, Lin W, Cheng B, et al. Association
11 between Oxidative Stress and Outcome in Different Subtypes of Acute
12 Ischemic Stroke. *BioMed Research International*. 2014.
- 13 95. Venes D, Clarence WT. In: Venes D, editor. *Taber's Cyclopedic Medical*
14 *Dictionary*. 21st ed. Philadelphia: F.A. Davis. 2005. p. 1089.
- 15 96. Venketasubramanian N, Woo Yoon B, Pandian J, Navarro JC. Stroke
16 Epidemiology in South, East, and South-East Asia: A Review.
17 *JournalofStroke*. 2017. V.19 (3): 286-294.
- 18 97. Weiss N. Mechanisms of increased vascular oxidant stress in
19 hyperhomocys-teinemia and its impact on endothelial function.
20 *CurrDrugMetab*. 2005. 6(1):27-36.
- 21 98. White BC, Sullivan JM, Degracia DJ, O'neil BJ, Neumar RW, Grossman
22 LI, Rafols JA, Krause GS. Brain ischemia and reperfusion: molecular
23 mechanisms of neuronal injury. *Journal of the Neurological Sciences*.
24 2000. V. 179:1–33.
- 25 99. WHO, Stroke, Cerebrovascular accident. Disponível em
26 <http://www.who.int/topics/cerebrovascular_accident/en/>. Acessado em
27 26 de outubro de 2017.
- 28 100. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillere-Blandin C, Nguyen-Khoa T,
29 Nguyen AT, Zingraff J, et al. Advanced oxidation protein products as a
30 novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int*. 1996. V. 49: 1304-
31 1313.
- 32 101. World Health Organization Collaborative Study of Cardiovascular
33 Disease and Steroid Hormone Contraception. Ischaemic stroke and

- 1 combined oral contraceptives: results of an international multicentre,
2 case-control study. *Lancet*. 1996. 348:498-510.
- 3 102. Ying W, Han SK, Miller JW, Swanson RA. Acidosis potentiates oxidative
4 neuronal death by multiple mechanisms. *J. Neurochem*. 1999. 73, 1549–
5 1556.
- 6 103. Zhao L, Qi Y, Xu L, Tao X, Han X, Yin L, Peng J. MicroRNA-140-5p
7 aggravates doxorubicin-induced cardiotoxicity by promoting myocardial
8 oxidative stress via targeting Nrf2 and Sirt2. *Redox Biology*. 2018. V. 15:
9 284–296.
- 10 104. Zheng H, Wu J, Jin Z, Yan L. J. Protein modifications as manifestations
11 of hyperglycemic glucotoxicity in diabetes and its complications,
12 *Biochem. Insights*. 2016. V. 9: 1–9.
- 13

1 **9. ANEXOS**

2

3 ANEXO 1 – APROVAÇÃO PELO COMITE DE ÉTICA EM PESQUISA

4 ENVOLVENDO SERES HUMANOS DA UEL

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

5

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

6

1 ANEXO 2 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA
2 GRUPO DE PACIENTES COM AVC

3
4 **``RESPOSTA INFLAMATÓRIA E IMUNOLÓGICA NOS PACIENTES COM**
5 **ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL ISQUÊMICO AGUDO E SUA RELAÇÃO**
6 **COM O DEFICIT NEUROLÓGICO E EVOLUÇÃO CLÍNICA``**

7 Prezado (a) Senhor (a):

8
9 Gostaríamos de convidá-lo a participar da pesquisa **“RESPOSTA**
10 **INFLAMATÓRIA E IMUNOLÓGICA NOS PACIENTES COM ACIDENTE**
11 **VASCULAR CEREBRAL ISQUÊMICO AGUDO E SUA RELAÇÃO COM O**
12 **DEFICIT NEUROLÓGICO E EVOLUÇÃO CLÍNICA”**, realizada no Hospital
13 Universitário da Universidade Estadual de Londrina. O objetivo da pesquisa é
14 saber se existe algum exame de sangue que possa indicar de forma mais
15 rápida e simples sinais de que um acidente vascular cerebral (AVC ou derrame
16 no cérebro) tem maiores riscos de evoluir de maneira desfavorável. A sua
17 participação é muito importante e ela se daria da seguinte forma: **coleta de**
18 **amostra de sangue (20 ml) no dia de sua entrada no hospital e após três**
19 **meses da alta hospitalar, na época do atendimento ambulatorial para**
20 **avaliação do quadro clínico**. Gostaríamos de esclarecer que sua participação
21 é totalmente voluntária, podendo você: recusar-se a participar, ou mesmo
22 desistir a qualquer momento sem que isto acarrete qualquer ônus ou prejuízo à
23 sua pessoa. Informamos ainda que as informações serão utilizadas somente
24 para os fins desta pesquisa e serão tratadas com o mais absoluto sigilo e
25 confidencialidade, de modo a preservar a sua identidade.

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

33 Os benefícios esperados são que caso a hipótese da pesquisa seja
34 confirmada, estes resultados poderão agilizar e facilitar os tratamentos
35 disponíveis para um derrame. O sangue que será coletado para a pesquisa

1 será parte da mesma coleta de exames de rotina que será realizada
2 independentemente de sua participação ou não no estudo e desta forma, não
3 vos acarreta em nenhum risco adicional.

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

8 Caso você tenha dúvidas ou necessite de maiores esclarecimentos pode
9 contatar o médico **Dr. Márcio Francisco Lehmann, pelo telefone 43 - 9928**
10 **5518, ou e-mail mflehmann@hotmail.com ou procurá-lo no Hospital**
11 **Universitário de Londrina, na Av. Robert Koch 60, 3371-2000, Setor de**
12 **Neurologia),** ou procurar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres
13 Humanos da Universidade Estadual de Londrina, na Avenida Robert Koch, nº
14 60, ou no telefone 3371-2490. Este termo deverá ser preenchido em duas vias
15 de igual teor, sendo uma delas, devidamente preenchida e assinada entregue a
16 você.

17 Londrina, ___ de _____ de 20__.

18
19 **Pesquisador Responsável: Dr. Márcio Francisco Lehmann, médico,**
20 **CRM/PR 16.049. RG 4.481.314-9 SSP/PR, fone: 43 - 9928 5518,**
21 **e-mail: mflehmann@hotmail.com**

22
23 _____(nome por extenso do sujeito de
24 **pesquisa)**, tendo sido devidamente esclarecido sobre os procedimentos da
25 pesquisa, concordo em participar **voluntariamente** da pesquisa descrita acima.

26 Assinatura (ou impressão dactiloscópica): _____

27 Data: _____

28
29
30
31
32

1 ANEXO 3 - QUESTIONÁRIO PARA COLETA DE DADOS PACIENTES E
2 CONTROLES

3
4 **RESPOSTA INFLAMATORIA E IMUNOLÓGICA NOS PACIENTES COM**
5 **ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL E SUA CORRELAÇÃO COM O**
6 **PROGNÓSTICO CLÍNICO.**

7
8 Projeto de Pesquisa aprovado pelo CEP/UEL, Protocolo 19382/10,
9 CAE 0176.0.268.000-10

10
11 Data de internação ____/____/____ Horário da coleta ____:____

12 **IDENTIFICAÇÃO**

13 Nome:

14 _____ ID _____

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

16 Etnia _____

17
18 Antecedentes Mórbidos Pessoais: () HAS () DM
19 () Dislipidemia () Sedentarismo
20 () Dça Autoimune () Dça

21 Hematológica

22 () Dça Infecçiosa () AVC ()

23 IAM

24 Outros:

25 _____

26 _

27 Medicamentos de uso contínuo:

28 _____

29 () Uso de antioxidantes () Uso de vitaminas

30 Outros _____

31
32 Antecedentes Mórbidos Familiares: () HAS () DM () Dislipidemia

33 () AVC () IAM ()

34 Outro: _____

- 1
2 Condições e hábitos de vida: () Tabagismo () Etilismo ()
3 Sedentarismo
4 Historia Clínica e Exame Físico da Entrada (*baseline*):
5 Peso (Kg) _____ Altura (m)
6 _____
7 Pressão arterial (mmHg) _____ Circunferência abdominal
8 (cm) _____
9 Atividade física:
10 () SIM () 1x semana () 2x semana () 3x semana () > 3 x
11 semana
12 () NÃO

13

14 Escala de Rankin Modificada

15 0- Nenhum sintoma

16 1- Não apresenta incapacidade significativa, apenas sintomas; capaz de
17 realizar as obrigações e atividades habituais18 2- Leve incapacidade; incapaz de realizar todas as atividades prévias, porém
19 capaz de realizar os cuidados consigo próprio sem assistência.20 3- Moderada incapacidade; necessita alguma ajuda, consegue andar sem
21 ajuda22 4- Moderada /ou severa incapacidade; incapaz de andar sem assistência e não
23 consegue realizar sozinho os cuidados consigo próprio24 5- Incapacidade grave; acamado e sob cuidados constantes de enfermagem,
25 incontinente.

26 6- Morte

27

28 **TOTAL (0–6): _____**

29