



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

DANIELA FRIZON ALFIERI

**ASSOCIAÇÃO ENTRE O STATUS DE VITAMINA D E MARCADORES
INFLAMATÓRIOS EM PACIENTES COM ACIDENTE VASCULAR
ENCEFÁLICO ISQUÊMICO AGUDO**

Londrina
2016

DANIELA FRIZON ALFIERI

**ASSOCIAÇÃO ENTRE O STATUS DE VITAMINA D E MARCADORES
INFLAMATÓRIOS EM PACIENTES COM ACIDENTE VASCULAR
ENCEFÁLICO ISQUÊMICO AGUDO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dra. Edna Maria Vissoci Reiche.

Londrina
2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

A387a Alfieri, Daniela Frizon.

Associação entre o status de vitamina D e marcadores inflamatórios em pacientes com acidente vascular encefálico isquêmico agudo / Daniela Frizon Alfieri. - Londrina, 2016.

92 f.: il.

Orientador: Edna Maria Vissoci Reiche.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2016.

Inclui bibliografia.

1. Acidentes vasculares cerebrais - Teses. 2. Vitamina D - Teses. 3. Inflamação - Teses. I. Reiche, Edna Maria Vissoci. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDU 616.831

DANIELA FRIZON ALFIERI

**ASSOCIAÇÃO ENTRE O STATUS DE VITAMINA D E MARCADORES
INFLAMATÓRIOS EM PACIENTES COM ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO
ISQUÊMICO AGUDO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa Dra. Edna Maria Vissoci Reiche
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Isaías Dichi
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Vinicius Daher Delfino
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Márcio Francisco Lehmann
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Marcell Batist Lozovoy
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 24 de março de 2016.

AGRADECIMENTOS

À Deus e Nossa Senhora, por me permitirem a iniciar e concluir este trabalho.

À minha família, principalmente aos meus pais e à minha avó, que são exemplos de sabedoria e esperança, pelo esforço contínuo e pelas dificuldades enfrentadas para que tudo fosse possível.

À minha orientadora Professora Dra. Edna Maria Vissoci Reiche pela confiança, dedicação, carinho e paciência em me orientar.

Aos professores Dra. Elaine Regina Delicato de Almeida, Dr. Marcell Alysson Batisti Lozovoy e em especial à professora Dra. Andrea Name Colado Simão que sempre esteve à disposição para me ajudar e me coorientar com muita sabedoria.

À Tamires Flauzino pela enorme amizade e parceria, juntas enfrentamos todos os obstáculos com muitas risadas e cooperação.

Às minhas amigas Francieli Delongui, Nicole Stadtlober, Ana Paula Kallaur, Sayonara Rangel Oliveira, Maria Caroline Martins de Araújo e Rafaela Maria Tirolla, que me ajudaram para a realização deste trabalho.

Aos funcionários do Setor de Imunologia Clínica do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina.

Aos pacientes e seus familiares.

ALFIERI, Daniela Frizon. **Associação entre o status de vitamina D e marcadores inflamatórios em pacientes com acidente vascular encefálico isquêmico agudo**. 2016. 92 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

RESUMO

O acidente vascular encefálico isquêmico (AVEi) é uma das principais causas de morte e incapacidade em todo o mundo. Como uma doença complexa, apresenta interação entre fatores não modificáveis e modificáveis. A vitamina D tem sido objeto de estudos em várias doenças infecciosas, autoimunes e cardiovasculares pelas suas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes. A deficiência deste hormônio modifica indiretamente o risco de AVEi pela associação com fatores de risco clássicos, como diabetes mellitus (DM), dislipidemia, hipertensão e fibrilação atrial. O objetivo deste estudo foi avaliar a associação entre o status de vitamina D e o AVEi agudo, marcadores inflamatórios e a evolução clínica. O estudo incluiu 168 pacientes com AVEi atendidos no Pronto Socorro do Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, e 118 controles sem histórico de AVEi e infarto agudo do miocárdio. Foram coletados dados demográficos, antropométricos, epidemiológicos e clínicos. O subtipo de AVEi foi classificado segundo os critérios de TOAST e a incapacidade funcional dos pacientes foi avaliada no momento da admissão e após três meses de evolução pela Escala de Rankin Modificada (mRS). Amostras de sangue periférico foram coletadas em até 24 horas após o diagnóstico de AVEi para a determinação de marcadores inflamatórios, tais como contagem de leucócitos periféricos e plaquetas, velocidade de hemossedimentação (VHS), níveis séricos de proteína C reativa ultrasensível (usPCR), ferritina, fator de necrose tumoral (TNF)- α , interleucina (IL)-6 e IL-10. A vitamina D foi avaliada pela forma 25-hidroxivitamina D [25(OH)D] utilizando imunoensaio quimioluminescente de micropartículas e seu valor foi utilizado para classificar os indivíduos em três subgrupos, como vitamina D suficiente (VDS) (≥ 30 ng/mL), vitamina D insuficiente (VDI) (20-29,9 ng/mL) e vitamina D deficiente (VDD) ($< 20,0$ ng/mL). A associação entre o status de vitamina D e o AVEi foi avaliada usando análise de regressão logística binária em diferentes modelos, controlados para covariáveis que poderiam confundir a associação de interesse. Análises de regressão logística multinomial graduais automáticas foram utilizadas para definir as variáveis significativas, com intervalo de confiança (IC) de 95% do status de vitamina D em AVEi agudo utilizando as variáveis com valor de $p < 0,1$. Entre os pacientes, 96 (57,14%) eram homens e os riscos modificáveis mais frequentes para AVEi foram hipertensão (145/83,30%), dislipidemia (74/44,04%), DM (64/38,1%) e tabagismo (39/23,21%). Segundo os subtipos do AVEi, 58 (34,53%) pacientes apresentaram aterosclerose de grandes artérias (LAAS), 53 (31,55%) infarto lacunar (LAC), 26 (15,47%) cardioembólico, 5 (2,98%) AVEi de outras etiologias (ODE) e 26 (15,47%) AVEi de etiologia indeterminada (UDE). Os pacientes apresentaram maior frequência de DM ($p=0,025$) tabagismo, hipertensão arterial e VDD do que os controles ($p < 0,0001$). Enquanto 73 (43,5%) pacientes apresentaram VDD, apenas 6 (5,1%) dos controles apresentaram este status da vitamina D. Os níveis [média \pm erro padrão da média (SEM)] de 25(OH)D foram 22,54 ng/mL (0,82) nos pacientes e 30,37 ng/mL (0,80) no grupo controle ($p < 0,0001$). Após o ajuste das variáveis associadas à ocorrência de AVEi agudo, como idade, sexo, etnia, índice de massa

corpórea (IMC), tabagismo, presença de DM, hipertensão arterial, dislipidemia e medicamentos, os pacientes com VDD mostraram 18,40 vezes mais chance de terem o AVEi agudo do que aqueles com VDS (IC 95%: 6,14-55,175, $p < 0,0001$). Os pacientes apresentaram maiores valores de VHS e ferritina ($p = 0,002$), maior contagem total de leucócitos periféricos, usPCR, IL-6 ($p < 0,0001$) e TNF- α ($p = 0,018$) quando comparados aos controles. Pacientes com status de VDD eram com maior frequência do sexo feminino, mais idosos e com mRS mais elevado no início do estudo do que aqueles com VDI e VDS ($p = 0,008$, $p = 0,003$ e $p = 0,047$, respectivamente). Além disso, os níveis de VHS foram maiores nos pacientes com VDD do que aqueles com VDS ($p = 0,016$) e os níveis séricos de usPCR e IL-6 foram maiores nos pacientes com VDD do que nos pacientes com VDI e VDS ($p = 0,002$ e $p = 0,001$, respectivamente). Após análise de regressão logística multinomial, as variáveis sexo e níveis de usPCR permaneceram significativamente associadas com a VDD ($p = 0,023$ e $p = 0,043$, respectivamente). Quando os pacientes foram avaliados após três meses do evento isquêmico, os que apresentaram pior evolução (mRS ≥ 3) apresentaram menores níveis de 25(OH)D ($p = 0,008$) quando comparados com os pacientes com melhor prognóstico (mRS < 3), resultado independente da idade, sexo e mRS de entrada. Além disso, os níveis de 25(OH)D apresentaram correlação negativa com o mRS obtido após três meses de seguimento dos pacientes ($r = -0,239$, $p = 0,005$). Em conclusão, os resultados mostraram que a VDD está associada ao AVEi agudo e com níveis mais elevados de usPCR, e baixos níveis deste hormônio foram associados com pior prognóstico a curto prazo dos pacientes. Estes resultados sugerem um possível papel da vitamina D na fisiopatologia do AVEi exercendo um efeito modulador na resposta inflamatória destes pacientes. Novos estudos com maior número de pacientes devem ser realizados para uma melhor compreensão do papel deste micronutriente na fisiopatologia do AVEi agudo.

Palavras-chave: Acidente vascular encefálico. Vitamina D. Inflamação. Proteína C reativa.

ALFIERI, Daniela Frizon. **Association between vitamin D status and inflammatory markers in patients with acute ischemic stroke.** 2016. 92 p. Dissertation (Master's degree in Health Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

ABSTRACT

Ischemic stroke is a major cause of death and disability worldwide. As a complex disease, shows an interaction between non-modifiable and modifiable risk factors. Vitamin D has been studied in infectious, autoimmune, and cardiovascular diseases for its anti-inflammatory and antioxidant properties. Deficiency of this hormone indirectly modifies the risk for ischemic stroke through association with classic risk factors, such as diabetes mellitus (DM), dyslipidemia, hypertension, and atrial fibrillation. The objective of this study was to evaluate the association between vitamin D status and inflammatory markers and ischemic stroke, and with clinical outcome. The study included 168 patients with acute ischemic stroke treated at the Emergency Room of the University Hospital of the State University of Londrina, Londrina, Paraná, and 118 controls with no history of ischemic stroke and acute myocardial infarction. Demographic, anthropometric, clinical, and epidemiological data were collected. The ischemic stroke subtype was classified according to TOAST criteria and functional impairment of the patients was assessed on admission and after three-month follow-up using the modified Rankin Scale (mRS). Non fasting peripheral blood samples were collected within 24 hours after the diagnosis of ischemic stroke to measure inflammatory markers, such as peripheral white blood cell and platelet counts, erythrocyte sedimentation rate (ESR), serum levels of high sensitivity C-reactive protein (hsCRP), ferritin, tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-6, and IL-10. Vitamin D was assessed through the 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D] using chemiluminescent microparticle immunoassay and its value was used to classify individuals into three subgroups as vitamin D sufficient (VDD) (≥ 30.0 ng/dL), vitamin D insufficient (VDI) (20 to 29.9 ng/mL), and vitamin D deficient (VDD) (< 20.0 ng/mL). The association between vitamin D status and acute ischemic stroke was evaluated using binary logistic regression analysis with controlling covariates with could have confounded the association of interest in different models. Automatic stepwise multinomial logistic regression analyses was used to define the significant associations, with 95% confidence interval (IC) of vitamin D status in acute ischemic stroke using the variables with p value < 0.10 . Among the patients, 96 (57.14%) were men and the most common modifiable risk for ischemic stroke were hypertension (145/83.30%), dyslipidemia (74/44.04%), DM (64/38.1%), and smoking (39/23.21%). According to the subtypes of ischemic stroke, 58 (34.53%) patients had atherosclerosis of large arteries stroke (LAAS), 53 (31.55%) lacunar stroke (LAC), 26 (15.47%) cardioembolic, 5 (2.98%) stroke of other etiologies (ODE), and 26 (15.47%) stroke of undetermined etiology (EDU). Patients presented higher frequency of smoking ($p < 0.0001$), hypertension ($p < 0.0001$), DM ($p = 0.025$), and VDD than controls ($p < 0.0001$). While 73 (43.5%) patients presented VDD, only 6 (5.1%) of the controls showed this vitamin D status ($p < 0.0001$). Levels [mean \pm standard error of mean (SEM)] of 25 (OH)D were 22.54 ng/mL (0.82) in patients and 30.37 ng/mL (0.80) in the controls ($p < 0.0001$). After adjusting the variables associated with the occurrence of acute ischemic stroke, such as age, sex, ethnicity, body mass index (BMI), presence of DM, hypertension, dyslipidemia, and vitamin D levels, patients with VDD showed 18.40 times more likely to have the acute

ischemic stroke than those with VDI or VDS (95% IC: 6.14-55.17, $p < 0.0001$). Patients presented higher ESR ($p = 0.002$), total peripheral leukocyte counts ($p < 0.0001$), hsCRP ($p < 0.0001$), IL-6 ($p < 0.0001$), ferritin ($p = 0.002$), and TNF- α ($p = 0.014$) than controls. Patients with VDD status were more likely to be female, older, and with higher mRS at baseline than those with VDI and VDS status ($p = 0.008$, $p = 0.003$, and $p = 0.047$, respectively). Moreover, ESR were higher in patients with VDD than those with VDS ($p = 0.016$) and hsCRP and IL-6 serum levels were higher in patients with VDD than VDI and VDS patients ($p = 0.002$ and $p = 0.001$, respectively). After multinomial logistic analysis, sex and hsCRP levels remained significantly associated with ischemic stroke ($p = 0.023$ and $p = 0.043$, respectively). When patients were evaluated three months after the ischemic event, those with poor outcome (mRS ≥ 3) had lower levels of 25(OH)D ($p = 0.008$) compared with patients with good outcome (mRS < 3) independently of age, sex and mRS at baseline. Furthermore, levels 25(OH)D were negatively correlated with mRS obtained after three-months of follow-up ($r = -0.239$, $p = 0.005$). In conclusion, the results showed that the VDD is associated with acute ischemic stroke and higher levels of hsCRP, and low levels of this hormone have been associated with poor short-term outcome of the patients. These results suggest a possible role of vitamin D in the pathophysiology of ischemic stroke exerting a modulatory effect on the inflammatory response in these patients. Further studies with larger numbers of patients should be conducted to better understand the role of this micronutrient in acute ischemic stroke pathophysiology.

Keywords: Ischemic stroke. Vitamin D. Inflammation. C-reactive protein.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-------------------------|---|
| 1,25(OH) ₂ D | <i>1,25-dihydroxyvitamin D</i> - 1,25-dihidroxivitamina D |
| 25(OH)D | 25-hydroxyvitamin D - 25-hidroxivitamina D |
| AIT | Acidente isquêmico transitório |
| APC | <i>Antigen-presenting cell</i> - Célula apresentadora de antígeno |
| ATP | Adenosina trifosfato |
| AVE | Acidente vascular encefálico |
| AVEi | Acidente vascular encefálico isquêmico |
| BBB | <i>Blood Brain Barrier</i> - Barreira hematoencefálica |
| BHE | Barreira hematoencefálica |
| BMI | <i>Body Mass Index</i> - Índice de massa corpórea |
| CEI | <i>Cardioembolic Infarct</i> - Infarto cardioembólico |
| CI | <i>Confidence interval</i> |
| CNS | <i>Central nervous system</i> – Sistema nervoso central |
| COX | Ciclooxigenase |
| CRP | <i>C-reactive protein</i> – Proteína C reativa |
| CT | <i>Computed Tomography</i> - Tomografia computadorizada |
| D2 | Ergocalciferol |
| D3 | Calciferol |
| DBP | <i>Diastolic blood pressure</i> - Pressão sanguínea diastólica |
| DNA | <i>Deoxyribonucleic acid</i> - Ácido desoxirribonucleico |
| EROS | Espécies reativas de oxigênio |
| GDNF | Fator neurotrófico derivado da linha de células da glia |
| HBV | Vírus da hepatite B |
| HCV | Vírus da hepatite C |
| HDL | <i>High-density lipoprotein</i> - Lipoproteína de alta densidade |
| HIV | <i>Human immunodeficiency virus</i> - Vírus da imunodeficiência humana |
| hsCRP | <i>High sensitive C-reactive protein</i> – Proteína C reativa de alta sensibilidade |
| IC | Intervalo de confiança |
| ICAM-1 | <i>Intracellular adhesion molecule 1</i> - Molécula de adesão intercelular 1 |
| IFN | <i>Interferon</i> – Intérferon |

| | |
|-------|--|
| IL | <i>Interleukin</i> - Interleucina |
| IMC | Índice de massa corpórea |
| IκB | Inibidor de <i>kappa</i> B |
| JNK | C-jun N-terminal quinase |
| LAAS | <i>Large artery atherosclerosis</i> - Aterosclerose de grandes artérias |
| LAC | <i>Lacunar infarct</i> - Infarto lacunar |
| LCR | Líquido cefalorraquidiano |
| LDL | <i>Low-density lipoprotein</i> - Lipoproteína de baixa densidade |
| Ln | <i>Logarithmic</i> - Logaritmo |
| NO | Óxido nítrico |
| iNOS | Óxido nítrico induzível |
| LPS | Lipopolissacarídeo |
| MAKP | <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i> – Proteína quinase ativada por mitógenos |
| MMP | <i>Matrix metalloproteinase</i> - Metaloproteinases de matriz |
| mRNA | <i>Messenger ribonucleotide acid</i> - Ácido ribonucleotídeo mensageiro |
| mRS | <i>Modified Rankin Scale</i> - Escala de Rankin modificada |
| NF-κB | <i>Nuclear factor kappa B</i> - Fator nuclear <i>kappa</i> B |
| ODE | Other determined etiology - AVEi de outra etiologia determinada |
| OR | <i>Odds ratio</i> – razão de chance |
| PAD | Pressão arterial diastólica |
| PAS | Pressão arterial sistólica |
| PCR | Proteína C reativa |
| PTH | Paratormônio |
| RAA | Renina-angiotensina-aldosterona |
| RMN | Ressonância magnética nuclear |
| RXR | Receptor retinóico X |
| SBP | <i>Systolic blood pressure</i> – Pressão sanguínea sistólica |
| SEM | <i>Standard error of mean</i> – Erro padrão da média |
| SNC | Sistema nervoso central |
| TGF | <i>Transforming growth factor</i> - Fator de crescimento transformador |
| Th | <i>T helper</i> |
| TIA | <i>Transient ischemic attack</i> – Ataque isquêmico transitório |

| | |
|--------|--|
| TLR | <i>Toll-like receptors</i> – Receptores semelhante a toll |
| TNF | <i>Tumor necrosis factor</i> - Fator de necrose tumoral |
| TNFR1 | Receptor de fator de necrose tumoral 1 |
| TNFR2 | Receptor de fator de necrose tumoral 2 |
| TOAST | <i>Trial of Org in10172 Acute Stroke</i> |
| Treg | Linfócito T regulador |
| UDE | <i>Undetermined etiology</i> - AVEi com etiologia indeterminada |
| usPCR | Proteína C reativa ultrasensível |
| UVB | Ultravioleta B |
| VCAM-1 | <i>Vascular cell adhesion molecule 1</i> - Molécula de adesão celular vascular |
| VDBP | Proteína carreadora de vitamina D |
| VDD | <i>Vitamin D deficient</i> - Vitamina D deficiente |
| VDI | <i>Vitamin D insufficient</i> - Vitamina D insuficiente |
| VDR | <i>Vitamin D receptor</i> - Receptor de vitamina D |
| VDS | <i>Vitamin D sufficient</i> - Vitamina D suficiente |
| VHS | Velocidade de hemossedimentação |

SUMÁRIO

| | | |
|-----------|---|----|
| 1. | INTRODUÇÃO | 13 |
| 1.1. | Acidente Vascular Encefálico e Inflamação | 15 |
| 1.1.1. | Infiltração de leucócitos | 16 |
| 1.1.2. | A regulação da transcrição de moléculas inflamatórias | 17 |
| 1.1.3. | Proteínas de fase aguda | 18 |
| 1.2. | Vitamina D | 22 |
| 1.2.1. | Síntese da vitamina D | 22 |
| 1.2.2. | Vitamina D e o sistema imune | 26 |
| 1.2.3. | Vitamina D e efeitos no sistema nervoso central | 28 |
| 1.2.4. | Vitamina D e doença cardiovascular | 30 |
| 1.2.4.1. | Vitamina D e o acidente vascular encefálico isquêmico | 32 |
| 2. | JUSTIFICATIVA | 34 |
| 3. | OBJETIVO | 35 |
| 3.1. | Objetivo Geral | 35 |
| 3.2. | Objetivos Específicos | 35 |
| 4. | MATERIAIS E MÉTODOS | 36 |
| 4.1. | Aspectos Éticos | 36 |
| 4.2. | Delineamento | 36 |
| 4.3. | População | 36 |
| 4.4. | Amostra | 36 |
| 4.5. | CrITÉrios de Exclusão | 38 |
| 4.6. | Exames Laboratoriais | 38 |
| 4.6.1. | Vitamina D | 39 |
| 4.6.2. | Marcadores inflamatórios | 39 |
| 4.7. | Análise Estatística | 40 |
| 5. | RESULTADOS | 41 |
| 6. | CONCLUSÃO | 69 |
| 7. | CONSIDERAÇÕES FINAIS | 70 |
| 8. | REFERÊNCIAS | 71 |
| | ANEXOS | 86 |
| | APÊNDICE | 87 |

1. INTRODUÇÃO

O acidente vascular encefálico (AVE) é definido como uma súbita perda de função cerebral resultante de interferência no suprimento sanguíneo e é a segunda maior causa de mortalidade e morbidade, principalmente na população acima dos 55 anos de idade, causando forte impacto econômico e social (NASI, 2009). O *National Health and Nutrition Examination Survey* indica que 6,8 milhões de norte-americanos (2,8% da população) maiores de 20 anos têm diagnóstico relacionado ao AVE. A cada ano, 795.000 pessoas sofrem um episódio de AVE (610.000 casos novos/185.000 casos recorrentes). Projeções indicam que esse número deve chegar a 10 milhões de vítimas em 2030 nos Estados Unidos da América (GO et al., 2014).

No Brasil, o AVE ocorre com maior frequência na faixa etária superior a 50 anos, sendo responsável por 10,0% do total de óbitos, 32,6% das mortes com causas vasculares e 40,0% das aposentadorias precoces. O país está entre os dez primeiros com maiores índices de mortalidade por AVE. O número de pacientes com AVE continua a aumentar ao longo das décadas e se tornará um importante problema socioeconômico, uma vez que 80,0% dos pacientes que sobrevivem ao AVE permanecem inativos permanentemente (ABRAMCZUK; VILLELA, 2009). Em 2010, segundo dados do Ministério da Saúde, o AVE foi responsável por 52,3 óbitos em 100 mil habitantes, representando 10% das internações em hospitais públicos do Brasil (BRASIL, 2013).

Os fatores de risco cardiovasculares modificáveis incluem hipertensão, dislipidemia, diabetes *mellitus* (DM) tipo 2, obesidade, sedentarismo, tabagismo, etilismo, fibrilação atrial, AVE e acidente isquêmico transitório (AIT) prévio, uso de anticoncepcional oral e estenose carotídea. Os não modificáveis incluem idade, sexo, etnia e variantes genéticas (ADAMS et al., 2007; BANERJEE et al., 2012; JICKLING; SHARP, 2011; PETERS; HUXLEY; WOODWARD, 2013; RENNA et al., 2014).

Cerca de 85,0% dos AVE são isquêmicos (AVEi) e decorrentes de uma obstrução arterial encefálica. Dos 15,0% restantes, 10,0% são decorrentes de hemorragia intracerebral espontânea e 5,0% de hemorragia subaracnóidea (GO et al., 2014). O AVEi, por sua vez, apresenta três etiologias principais: doença aterosclerótica de grandes artérias (LAAS), infarto lacunar (LAC) e infarto cardioembólico (CEI). Além dessas, existem inúmeras outras causas, como vasculites, trombofilias, anemia falciforme, dissecação arterial e doenças

genéticas, caracterizando como AVEi de outra etiologia determinada (ODE). Em até 30,0% dos casos, a etiologia não pode ser definida, caracterizando o AVEi de etiologia indeterminada (UDE). As principais causas relacionadas às hemorragias intracerebrais espontânea e subaracnóidea são, respectivamente, a hipertensão arterial sistêmica e os aneurismas e malformações arteriovenosas cerebrais (ROSAMOND et al., 2008).

A localização e o tamanho da área isquêmica variam na dependência de qual artéria é obstruída e causam desregulações metabólicas e funcionais. Após o evento isquêmico agudo, duas regiões principais de danos podem ser definidas de acordo com o suprimento de sangue restante: 1) núcleo do insulto que corresponde à área do cérebro onde ocorreu a escassez completa de fornecimento de sangue e 2) zona de penumbra que corresponde à área que rodeia o núcleo e que está hipoperfundida durante o período de oclusão (CEULEMANS et al., 2010). O metabolismo energético pode persistir nesta região de penumbra e, com a reperfusão, pode ser rapidamente recuperada (DE KEYSER et al., 2005; DIRNAGL; IADECOLA; MOSKOWITZ, 1999). Por conseguinte, a penumbra é um alvo atrativo para resgatar o tecido cerebral por permanecer potencialmente viável durante 16 a 48 horas, permitindo intervenção médica para reduzir os danos causados pelo AVEi (DE KEYSER et al., 2005).

As alterações celulares e moleculares presentes na cascata isquêmica após o AVEi agudo estão representadas na Figura 1 e podem ser explicadas em três fases. A primeira corresponde à fase aguda e ocorre dentro de minutos à algumas horas após o início da isquemia em que a diminuição do fluxo sanguíneo cerebral perturba a homeostase iônica, levando a um aumento das concentrações intracelulares de cálcio (Ca^{2+}) e estimulação da liberação de glutamato, que causa excitotoxicidade (BARONE; FEUERSTEIN, 1999; CHU et al., 2006). Nesta fase, ocorre aumento da entrada de água para o espaço intracelular devido a gradientes osmóticos resultando em edema vasogênico que pode influenciar negativamente a reperfusão, o que leva ao aumento da pressão intracraniana (BARONE; FEUERSTEIN, 1999). Além disso, a geração de espécies reativas de oxigênio (EROS), especialmente se ocorrer a reperfusão, pode danificar membranas, mitocôndrias e ácido desoxirribonucleico (DNA). A segunda fase é subaguda e ocorre em algumas horas até alguns dias após a isquemia, quando uma resposta apoptótica e neuroinflamatória desenvolve-se com o resultado da fase aguda (BARONE; FEUERSTEIN, 1999; DIRNAGL; IADECOLA; MOSKOWITZ, 1999). As altas concentrações de Ca^{2+} intracelular acumuladas durante a fase aguda culminam em

hiperatividade de vários sistemas de enzimas proteolíticas. Finalmente, na terceira fase, que pode durar até alguns meses depois do AVEi, a reparação e regeneração irão determinar a extensão final dos danos (CHU et al., 2006). Por contraditório que possa parecer, a reperfusão após uma oclusão pode exacerbar a lesão neuronal pelo do aumento da produção de EROS e da resposta inflamatória (DIRNAGL; IADECOLA; MOSKOWITZ, 1999). Por outro lado, restabelecer rapidamente o fornecimento de sangue é vital, pois pode evitar os danos irreversíveis na área de penumbra (CANDELARIO-JALIL, 2009) .

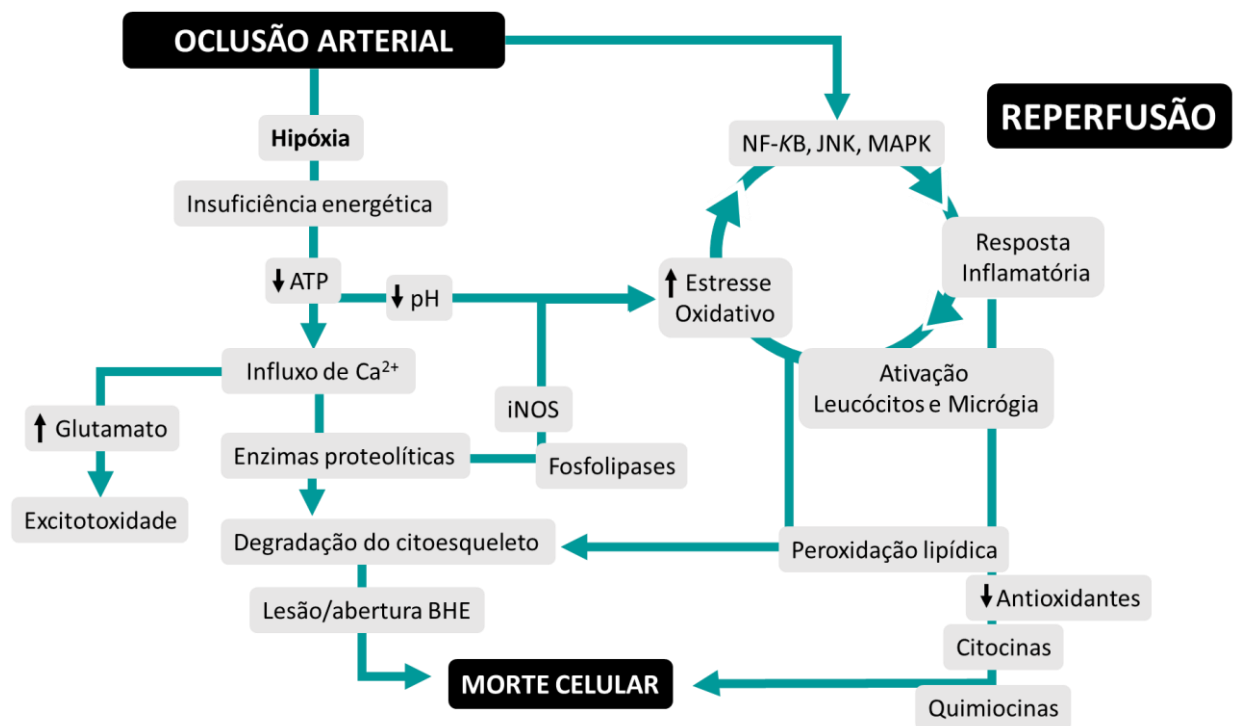


Figura 1 Alterações celulares e moleculares presentes na cascata isquêmica após o acidente vascular encefálico isquêmico agudo.

Fonte: Próprio autor.

1.1. Acidente Vascular Encefálico e Inflamação

Na isquemia cerebral, a resposta inflamatória desempenha um papel na depuração de detritos celulares; no entanto, também aumenta o dano ao tecido. A resposta imune no local da lesão é caracterizada pela infiltração, acúmulo e ativação de células

inflamatórias. Em poucas horas após o início da isquemia cerebral, leucócitos periféricos aderem ao endotélio cerebral, atravessam a parede do vaso e invadem o parênquima danificado (PETTY; WETTSTEIN, 2001; WANG; TANG; YENARI, 2007). Ao mesmo tempo, astrócitos e a micróglia são ativados. Estes eventos celulares dependem da secreção de mediadores inflamatórios que são produzidos por células neuronais e gliais em resposta a um insulto isquêmico. Uma vez ativadas no local da lesão, células inflamatórias começam a produzir uma grande variedade de agentes citotóxicos, tais como citocinas, quimiocinas e promovem o aumento da expressão de moléculas de adesão, metaloproteinases de matriz (MMPs) e a ruptura da barreira hematoencefálica (BHE).

As micróglia são os macrófagos residentes do cérebro, são muito sensíveis às alterações sutis no seu microambiente neuronal e, em resposta a uma lesão, rapidamente se tornam ativados e sofrem transformações morfológicas, bem como alterações funcionais (LADEBY et al., 2005; RAIVICH et al., 1999; STREIT; WALTER; PENNELL, 1999). Com a morte dos neurônios, estes macrófagos cerebrais são estimulados e proliferam rapidamente para sítios focais de lesões devido a um aumento da expressão de moléculas da superfície das células imunorreativas e pela produção de várias moléculas inflamatórias, tais como fatores quimiotáticos que induzem o recrutamento de outras células microgliais. Em modelo experimental de isquemia cerebral, o acúmulo da micróglia ativada é acompanhado por um aumento da expressão de interleucina (IL)-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, das citocinas fator de necrose tumoral (TNF)- α e intérferon (IFN)- γ e das quimiocinas (GARDEN; MÖLLER, 2006; HANISCH, 2002). Os astrócitos modulam as funções fagocíticas da micróglia e promovem a expressão de moléculas de adesão na unidade neurovascular em células endoteliais e leucócitos circulantes (BEZZI et al., 2001; KIMELBERG, 2005). Estes processos inflamatórios iniciais são prejudiciais para a sobrevivência dos neurônios.

1.1.1. Infiltração de leucócitos

Pouco tempo depois do início da isquemia, a BHE é aberta pela ruptura das junções endoteliais e a liberação de mediadores inflamatórios conduz à migração de leucócitos circulantes para o local da lesão em torno de 4-6 horas após o evento isquêmico (DEL ZOPPO; HALLENBECK, 2000; WANG; TANG; YENARI, 2007). A infiltração de leucócitos ocorre em três passos: rolamento na superfície das células endoteliais, a adesão à parede

endotelial e a migração ou a diapedese. A captura e migração inicial são mediadas por moléculas de adesão, tais como P, E e L-selectinas, molécula de adesão celular-vascular-1 (VCAM-1), molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) e integrinas (SUGHRUE et al., 2004). A ativação e acúmulo de leucócitos no cérebro isquêmico resultam em maiores danos. Evidências sugerem um papel imunológico prejudicial da cicloxigenase (COX)-2 a partir de neutrófilos e células vasculares no cérebro isquêmico (IADECOLA et al., 1999). O aumento da regulação de moléculas pró-inflamatórias e EROS após isquemia cerebral não são a única causa de lesão secundária. A expressão de genes de MMPs está relacionada com a presença de células inflamatórias no tecido isquêmico. Entre as MMPs, a MMP-9 está envolvida na degradação dos componentes da matriz extracelular e da lâmina basal, que pode potencializar complicações hemorrágicas após o AVEi (ROSELL et al., 2008).

Leucócitos ativados, especialmente neutrófilos, causam danos nas lesões isquêmicas reperfundidas. A contagem de neutrófilos foi considerada um preditor independente de AVEi recorrente (ERNST et al., 1987; GRAU et al., 2004). Reforçando este resultado, outro estudo demonstrou que a contagem de leucócitos totais e de neutrófilos puderam prever a ocorrência de futuros eventos isquêmicos (WU et al., 2013). Os neutrófilos exercem um papel no desenvolvimento e instabilidade da placa aterosclerótica e liberam substâncias que induzem vasoconstrição e agregação plaquetária (CARBONE; MACH; MONTECUCCO, 2015).

Após os neutrófilos, ocorre uma invasão de monócitos/macrófagos que atingem um pico cerca de uma semana após a isquemia (GARCIA; KAMIJYO, 1974) e contribuem para a fisiopatologia do estágio subagudo após o AVEi. Os monócitos circulantes são importantes fontes de IL-8, considerada uma forte quimiocina para neutrófilos. Além disto, os macrófagos derivados de monócitos podem iniciar e amplificar eventos trombogênicos pela expressão do fator tissular nas suas superfícies celulares (EDWARDS; RICKLES; BOBROVE, 1979).

1.1.2. A regulação da transcrição de moléculas inflamatórias

As alterações celulares e moleculares que ocorrem com a isquemia cerebral desencadeiam a ativação de vários fatores de transcrição envolvidos na resposta inflamatória. O fator nuclear *kappa* B (NFκB), quando ativado, induz a expressão de genes

que codificam as moléculas de adesão celular, receptores de superfície celular e citocinas (BAEUERLE; HENKEL, 1994; STEPHENSON et al., 2000). Proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) é uma das vias de sinalização que regula positivamente a transcrição de genes inflamatórios, tais como os que codificam o TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 e a COX-2 (COULTHARD et al., 2009). A ativação de C-jun N-terminal quinase (JNK) pode potencializar ainda mais a lesão do tecido cerebral e culminar com apoptose e necrose do tecido dentro de horas e dias (DEL ZOPPO et al., 2000; FEUERSTEIN; WANG; BARONE, ; ISHIKAWA et al., 2004). D-JNKI-1, um inibidor específico da via JNK, foi demonstrado induzir um forte efeito neuroprotetor em modelo experimental de isquemia cerebral (BORSELLO et al., 2003; HIRT et al., 2004).

1.1.3. Proteínas de fase aguda

A proteína C reativa (PCR) é uma proteína plasmática sintetizada pelo fígado, considerada um marcador inflamatório sistêmico e dinâmico (GABAY; KUSHNER, 1999). Sua concentração pode aumentar em mais de 10.000 vezes durante a resposta inflamatória aguda frente a infecções e danos teciduais graves. Exceto nestas situações, suas variações com a idade são semelhantes às dos níveis de colesterol e pressão arterial sistólica. Além disso, a quantificação dos níveis séricos de PCR por metodologia ultrasensível (usPCR), pode ser útil na avaliação do risco cardiovascular. A PCR está vinculada à lipoproteína de baixa densidade (LDL) do colesterol e está presente nas placas de aterosclerose; desta forma, seus níveis séricos estão associados ao risco coronário (KAPTOGE et al., 2010).

O aumento nos níveis séricos de PCR e fibrinogênio também são sinais de inflamação no AVEi e a PCR tem sido considerada como marcador de doença aterotrombótica e pode refletir o nível de atividade inflamatória dentro das placas ateroscleróticas (DANESH et al., 1998; ROST et al., 2001). Os níveis séricos de PCR têm sido considerados indicadores sensíveis de eventos cerebrovasculares iniciais e recorrentes (ARENILLAS et al., 2003; DI NAPOLI et al., 2005). Estudos sugerem uma associação entre determinados polimorfismos do gene da PCR, em que há maior produção de PCR, e risco para AVEi (MORITA; NAKAYAMA; SOMA, 2006).

Estudos prospectivos com indivíduos aparentemente saudáveis propuseram que, independentemente de outros fatores de risco cardiovascular, níveis plasmáticos

aumentados de PCR são preditores significativos de AIT e AVEi (ROST et al., 2001). A quantificação dos seus níveis por metodologia ultrasensível aumentou sua confiabilidade como preditor de risco cardiovascular. Níveis elevados de usPCR estão associados com um pior prognóstico após o AVEi e esta associação está mais relacionada à mortalidade e gravidade do AVEi do que sua recorrência. O significado prognóstico dos níveis séricos de PCR no AIT e AVEi agudo é descrito como de grande valor pois níveis elevados da PCR foram encontrados em pacientes com os piores resultados clínicos pós-AVEi agudo e indicam que o aumento nos níveis séricos desta proteína estariam associados à piora à curto prazo no AVEi (ABUBAKAR et al., 2013).

Bielewicz e colaboradores (2015) analisaram os níveis de PCR e S100BB (proteína derivada das células da glia e pode ser detectada no sangue como um resultado da destruição destas células e também pode ser considerada como um indicador de disfunção da BHE durando o evento isquêmico causada pela isquemia) no 1º, 3º, 5º e 10º dia após o AVEi, estes autores viram que os níveis de PCR se correlacionam diretamente com a piora clínica, além disso foi demonstrado uma correlação positiva com os níveis de PCR e volume da lesão isquêmica e a proteína S100BB. No grupo de pacientes com baixos níveis séricos PCR (0,51-24,68 mg/mL), os níveis de S100BB e o volume da área isquêmica foram menores do que no grupo com níveis elevados de PCR (24,69-209 mg/mL).

Níveis elevados de PCR foram associados com pior evolução após o AVEi e hemorrágico (CASTILLO et al., 2002; EVERETT et al., 2006). Uma coorte de 15.632 mulheres, inicialmente saudáveis, foram monitoradas clínica e laboratorialmente por um período de 10 anos e os resultados demonstraram um risco relativo de 2,76, com intervalo de confiança (IC) de 95%: 1,51-5,05 para um futuro AVEi e sugerem a usPCR como um marcador mais potente de um futuro AVEi quando comparada aos níveis de lipídeos, isoladamente (EVERETT et al., 2006). Recentemente, Zhou e colaboradores (2015), em uma metanálise, demonstraram que indivíduos que apresentaram altos níveis de usPCR tinham 46,0% mais risco de AVEi; no entanto, não observaram efeito deste marcador sobre a previsão de risco de AVE hemorrágico (ZHOU et al., 2015).

Di Napoli e colaboradores (2001) avaliaram a influência no prognóstico dos níveis de fibrinogênio e PCR em relação à evolução no primeiro ano pós AVEi em 128 pacientes. Os autores observaram que pacientes com oclusões pré-cerebrais tiveram aumento agudo nos níveis de PCR e que, apesar da melhora nos tratamentos para AVEi, permaneceu alta a

ocorrência de novos eventos no ano seguinte ao episódio inicial. O estudo sugeriu que elevados níveis de PCR estão associados ao aumento do risco de morte ou de um novo evento no ano seguinte (DI NAPOLI; PAPA; BOCOLA, 2001).

Uma vez que os pacientes com AVEi exibem vários fatores de risco, tais como hipertensão, DM e tabagismo, é possível que estes pacientes apresentem um estado inflamatório e pró-coagulante pré-existente, o que pode, pelo menos em parte, contribuir para o aumento dos valores da velocidade de hemossedimentação (VHS) após o AVEi (SINGH et al., 2014). A elevação dos valores de VHS é observada nas primeiras 24 após o AVEi e pode refletir a relação entre o grau de resposta de fase aguda em fase precoce do AVEi e a extensão do dano cerebral local (ZAREMBA; SKROBAŃSKI; LOSY, 2004). No entanto, a VHS é um marcador inespecífico de inflamação e deve ser analisado em conjunto com outros achados clínicos e laboratoriais.

As citocinas estão aumentadas em resposta a vários estímulos inflamatórios, entre eles a isquemia que ocorre no AVEi, e são expressas tanto pelas células do sistema imune, como também pelas células residentes do cérebro (LIU et al., 1994). As citocinas da imunidade inata, tais como a IL-1 β e TNF- α são as que iniciam esta resposta inflamatória. Esta ativação é muito precoce, porém transitória. As citocinas têm importante papel no desenvolvimento da reação da fase aguda, tais como febre, leucocitose, elevação das proteínas de fase aguda positivas e na expressão das moléculas de adesão, as quais contribuem para a agregação de leucócitos e posterior adesão na parede vascular (DEGRABA, 1998; HALLENBECK, 1996). As citocinas IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-10 e fator de transformação do crescimento (TGF)- β são as mais investigadas relacionadas ao AVEi (WANG; TANG; YENARI, 2007).

A micróglia ativada contribui com a maior parte da produção inicial de IL-1 β , seguida por astrócitos, neurônios e células endoteliais (ROTHWELL; LUHESHI, 2000). O aumento do mRNA de IL-1 β foi observado entre 15-30 minutos após isquemia (DAVIES et al., 1999) e a expressão tardia é devida a um influxo de células inflamatórias no sistema nervoso central (SNC) (LEGOS et al., 2000; ROTHWELL; LUHESHI, 2000). A IL-1 β promove proliferação e ativação de astrócitos que levam à astrogliose, exacerbação de perda neuronal e a maior gravidade do AVEi (DAVIES et al., 1999; SIMI et al., 2007). No SNC, IL-1 β estimula a sua própria produção e a expressão de outros mediadores pró inflamatórios.

Como a IL-1, o TNF- α também mostra um padrão de liberação bifásica com um primeiro pico de 1-3 horas e um segundo pico 24-36 horas após o evento isquêmico (HOSOMI et al., 2005; WANG; TANG; YENARI, 2007). Micróglia e macrófagos ativados são grandes produtores de TNF- α dentro das primeiras 6 horas após a isquemia cerebral (GREGERSEN; LAMBERTSEN; FINSEN, 2000; LAMBERTSEN et al., 2009). Níveis séricos de TNF- α estão elevados no líquido cefalorraquidiano (LCR) e no plasma de pacientes que sofreram AVEi (VILA et al., 2000). No entanto, é importante fazer a distinção entre o TNF- α solúvel e o ligado à membrana (MCCOY; TANSEY, 2008).

O TNF- α pode potencializar excitotoxicidade *in vitro* pela inibição da captação de glutamato (SRIRAM; O'CALLAGHAN, 2007; ZOU; CREWS, 2005). Esta citocina também ativa as células da glia, promovendo a sua própria produção e de outros mediadores neurotóxicos, e maior produção de EROS (LAMBERTSEN et al., 2009). O TNF- α estimula a apoptose de células endoteliais e contribui para o edema vasogênico e infiltração de células inflamatórias (CHRISTOV; OTTMAN; GRAMMAS, 2004). Por outro lado, o TNF- α ativa processos de reparação da microvasculatura cerebral e medeia a plasticidade neuronal (SRIRAM; O'CALLAGHAN, 2007).

Sugere-se que o efeito prejudicial do TNF- α ocorra na fase inicial da resposta inflamatória e os efeitos mais benéficos em uma fase posterior (AMANTEA et al., 2009). Outra hipótese relaciona-se com os receptores em que o TNF- α se liga. O TNF- α solúvel, que se liga ao receptor de TNF1 (TNFR1), iria causar efeitos prejudiciais, enquanto que principalmente o TNF- α ligado à membrana, que se liga ao receptor de TNF2 (TNFR2) seria um sinal para a neuroproteção (FONTAINE et al., 2002; LAI; TODD, 2006). Em contraste, os ratos *knockout* para ambos os receptores de TNF demonstraram volume maior de enfarte após a isquemia cerebral (BRUCE et al., 1996).

IL-6 é uma citocina pró-inflamatória com diversas funções biológicas e efeitos deletérios que podem contribuir para a lesão inflamatória inicial no cérebro. IL-6 é detectada 4 horas após o início do AVEi, com concentrações de pico depois de um dia e permanece detectável por até 14 dias (NILUPUL PERERA et al., 2006). A micróglia ativada, juntamente com astrócitos, neurônios e leucócitos compreendem as principais fontes de IL-6 (LEGOS et al., 2000). Tal como a IL-1 β , IL-6 é um pirógeno endógeno, atrai os linfócitos para o cérebro e contribui para exacerbação da resposta inflamatória (SHAAFI et al., 2014).

A IL-6 está envolvida na regulação da apoptose de neurônios e sua regulação é aumentada após a isquemia cerebral (HERRMANN et al., 2003). Estudos clínicos em pacientes com AVEi mostraram que a concentração sérica de IL-6 representa valor preditivo independente para mortalidade hospitalar (RALLIDIS et al., 2006). Além disso, o aumento dos seus níveis plasmáticos apresentou forte correlação com a intensidade da resposta de fase aguda, considerado um potente preditor para deterioração neuronal precoce (VILA et al., 2000). O aumento da IL-6 tem sido associado com maior volume da área infartada (CASTILLO et al., 2002) e com pior prognóstico do paciente (SMITH et al., 2004).

Na modulação da resposta inflamatória, citocinas como o TGF- β e IL-10 têm sido avaliadas no AVEi. Apenas duas das cinco diferentes isoformas do TGF- β são proeminentes após AVEi: TGF- β 1 e TGF- β 2. Em geral, o TGF- β controla os processos celulares tais como a proliferação, diferenciação, migração e apoptose (KIM, 1996; ZHU et al., 2000). Os níveis de TGF- β 1 estão aumentados após a isquemia e são capazes de reduzir a ativação glial, modular a expressão e a eficácia de outras citocinas, diminuir a produção de EROS, promover a angiogênese na área de penumbra e reduzir a aderência de neutrófilos às células endoteliais (PANTONI; SARTI; INZITARI, 1998). Em estudos experimentais, agonistas do TGF- β 1 mostraram reduzir a morte de células neuronais e o tamanho do infarto após o evento isquêmico (GROSS et al., 1993; HENRICH-NOACK; PREHN; KRIEGLSTEIN, 1996). Embora o TGF- β funcione, simultaneamente, em várias vias inflamatórias para proteger o cérebro, a concentração endógena é insuficiente para inibir danos graves após o AVEi (DHANDAPANI; BRANN, 2003).

Quanto à IL-10, esta citocina anti-inflamatória é expressa após o início do AVEi com pico em 3 dias. Animais *knockout* para o gene da IL-10 apresentam exacerbação da resposta inflamatória frente à isquemia cerebral e maior área de lesão (PÉREZ-DE PUIG et al., 2013); demonstrou-se, também, que a administração desta citocina pode reduzir os danos após isquemia cerebral experimental (SPERA et al., 1998). O aumento da expressão da IL-10 foi associado ao melhor prognóstico e parece estar relacionado aos fatores de recuperação cerebral pós-AVEi (PROTTI et al., 2013; VAN EXEL et al., 2002).

1.2. Vitamina D

1.2.1. Síntese da vitamina D

A vitamina D foi descrita pela primeira vez, em 1912, por Casimir Funk, e é encontrada em duas formas: ergocalciferol (D2), encontrada em alimentos de origem vegetal como produto da radiação do ergosterol, e calciferol (D3), sintetizada pela epiderme humana pela radiação ultravioleta B (UVB) e mediante ingestão de alimentos de origem animal (LEE et al., 2008). As células da epiderme contêm 7-deidrocolesterol que, sob radiação de raios UVB, é convertido para pré-vitamina D3 pela clivagem fotolítica seguido por um rearranjo termal espontâneo e se transforma em vitamina D3 que é liberada no sangue (MOZOS; MARGINEAN, 2015). Entretanto, quando há exposição solar em excesso, a pré-vitamina D3 é convertida por reação reversível em seus metabólitos biologicamente inativos, lumisterol e taquisterol; por sua vez, o uso de bloqueador solar, por absorver os raios UVB, diminui a produção de vitamina D3 (BIKLE, 2009; MATSUOKA et al., 1987). A proteína de ligação à vitamina D (VDBP) tem uma afinidade mais elevada para a vitamina D3 que D2 (ARMAS; HOLLIS; HEANEY, 2004) e isto resulta em uma meia vida mais longa da D3, sendo mais potente do que D2 (TRANG et al., 1998).

Tanto a vitamina D proveniente da dieta, via absorção intestinal, e a formada a partir da pré-vitamina D3 na epiderme são transportadas principalmente para o fígado pela VDBP (e uma menor porcentagem ligada à albumina) (BHAN, 2014) onde sofrem um processo de hidroxilação pelos citocromos 25-hidroxilase (CYP2R1) e esteroide 27-hidroxilase (CYP27A1) no carbono de posição 25, resultando em 25-hidroxivitamina D [25(OH)D] ou calcidiol. 25(OH)D é então hidroxilada novamente, desta vez no carbono 1, ao nível mitocondrial em células dos túbulos proximais renais, bem como em muitos outros tecidos, sob a ação do citocromo 1 α -hidroxilase (CYP27B1), finalmente produzindo a 1,25-diidroxivitamina D3 [1,25 (OH)₂D] ou calcitriol, a sua forma biologicamente ativa (MANDARINO et al., 2015). A Figura 2 sumariza as vias de síntese da vitamina D.

A forma ativa da vitamina D atravessa a membrana celular, entra na célula alvo e se liga ao receptor de vitamina D (VDR) que está presente no citoplasma. Este complexo, 1,25(OH)₂D-VDR, é submetido a translocação para o núcleo por meio do receptor do ácido retinóico (RXR). Em seguida, o complexo de 1,25(OH)₂D-VDR-RXR liga-se aos elementos de resposta de vitamina D no DNA aumentando a transcrição dos genes responsáveis pela expressão de proteínas envolvidas nas ações de vitamina D (HOLICK, 2007; PIKE et al., 2007). Direta ou indiretamente, a 1,25(OH)₂D regula mais de 200 genes, incluindo aqueles que

estão envolvidos na produção de renina no rim, a produção de insulina no pâncreas, liberação de citocinas pelos leucócitos, a produção de catelicidina em macrófagos e crescimento e proliferação do músculo liso vascular e cardiomiócitos (HOLICK, 2007).

Sabe-se que os VDR estão presentes em muitos tipos celulares, incluindo células hematopoiéticas, linfócitos, células epidérmicas, células pancreáticas, miócitos, neurônios, cardiomiócitos, células do músculo liso vascular, células endoteliais e do tecido placentário, além de osteoblastos, osteoclastos, células epiteliais intestino delgado e células tubulares renais, o que explica a multiplicidade de ações não calcêmicas exercidas pela vitamina D para vários tecidos, tais como o SNC e os sistemas endócrino, cardiovascular e imunológico, bem como as várias implicações da sua deficiência para a saúde (HOLICK, 2007).

Finalmente, 25(OH)D e 1,25(OH)₂D podem ser metabolicamente inativadas e transformadas em ácido calcitróico pela hidroxilação de 24-hidroxilase (CYP24A1), limitando assim a sua disponibilidade (PROSSER; JONES, 2004). A meia vida da vitamina D é diferente dependendo da sua forma, sendo de 60 dias para a vitamina D nutricional, 15 dias para 25(OH)D e em torno de 15 horas para a 1,25(OH)₂D (JONES, 2008). Embora os níveis séricos de 25(OH)D sejam 1000 vezes mais elevados que a 1,25(OH)₂D, a forma ativa da vitamina tem 1000 vezes mais afinidade pelo VDR do que a 25(OH)D (LIPS, 2007).

Os níveis séricos de 25(OH)D têm sido utilizados como marcador do status de vitamina D na população e obtidos por métodos sensíveis e específicos. No entanto, ainda não há um consenso internacional sobre os valores de referência deste hormônio bem como dos valores de corte a serem utilizados na definição de suficiência, insuficiência ou deficiência de vitamina D (VDD) (HOLICK et al., 2012; MANGIN; SINHA; FINCHER, 2014; ROSS et al., 2011).

A hipovitaminose D tem sido observada em indivíduos saudáveis de diferentes populações mundiais, em especial em idosos (MACLAUGHLIN; HOLICK, 1985; MOSEKILDE, 2005). Os níveis sérios de vitamina D são influenciados por vários fatores, tais como sexo, idade, etnia, índice de massa corpórea (IMC), geográficos, culturais, exposição solar, hábitos alimentares, além das variantes genéticas, em especial no gene que codifica o VDR. Além disto, a VDD não só provoca o raquitismo nas crianças, mas também agrava a osteoporose entre adultos e tem sido observada em várias condições incluindo hipertensão, resistência à insulina, diabetes mellitus (DM), câncer, doenças infecciosas e autoimunes, doença renal

crônica, doenças cardiovasculares e AVEI (revisado por HEWISON, 2012; HOLICK; CHEN, 2008; HOLICK, 2007; PALACIOS; GONZALEZ, 2014).

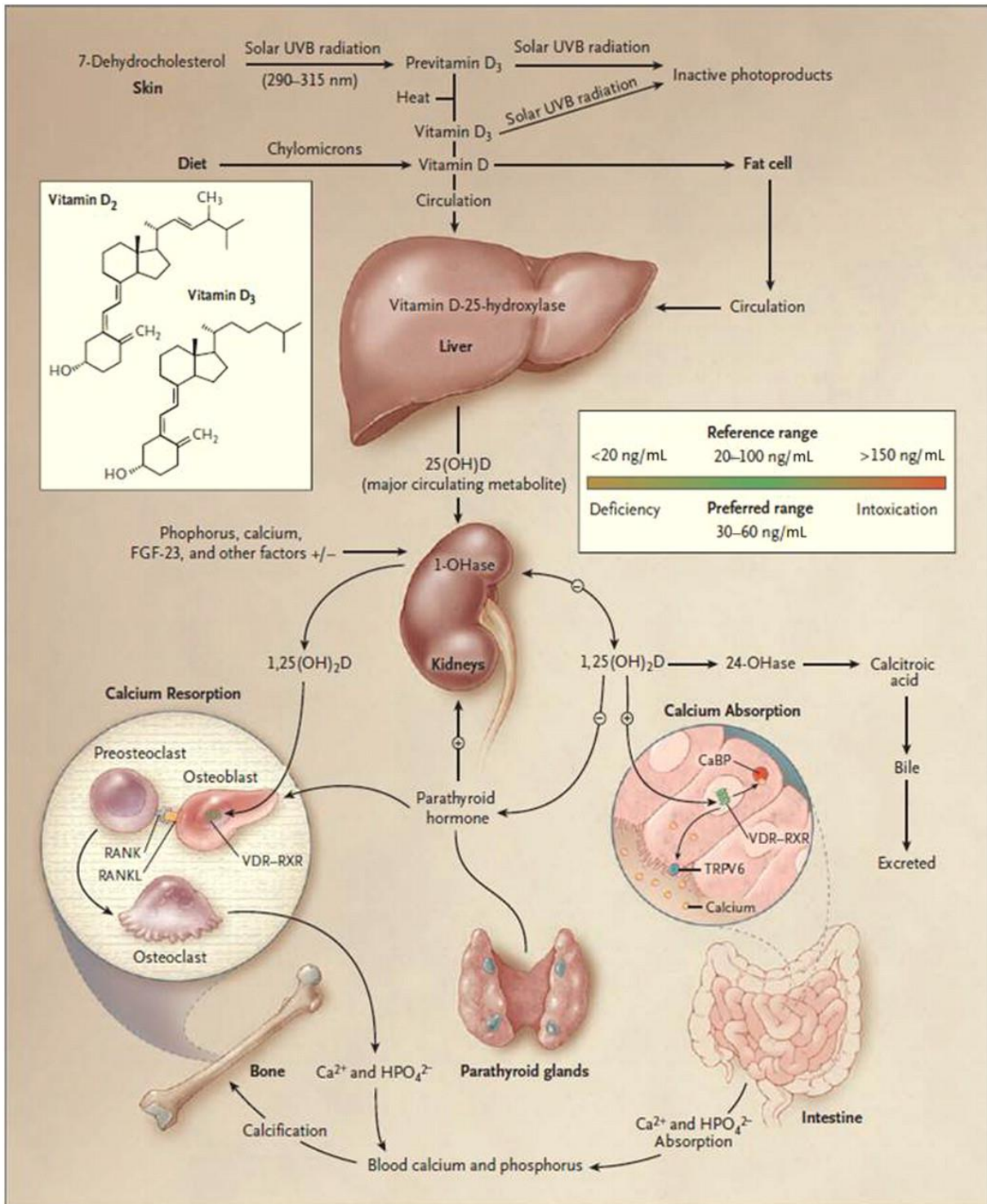


Figura 2 Síntese de Vitamina D

Fonte: HOLICK, M, F. (2007). Vitamin D deficiency. N. Engl. J. Med. 357 266–81.

1.2.2 Vitamina D e o sistema imune

O VDR é expresso, constitutivamente, em macrófagos e células dendríticas e, indutivamente, em linfócitos ativados. A $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ pode ser sintetizada por células apresentadoras de antígenos (APC) que expressam as enzimas 25-hidroxilase e 1α -hidroxilase, que permitem a produção de $25(\text{OH})\text{D}$ e $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, respectivamente, indicando um papel importante da vitamina D na modulação de resposta inflamatória (revisado por WHITE, 2012).

Na presença de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, ocorre diminuição da resposta mediada por células T *helper* (Th)1 com consequente diminuição da produção de IFN- γ e IL-2, assim como aumento da resposta mediada por Th2, com aumento da produção de IL-4, IL-5 e IL-10, causando um deslocamento da resposta imune para o padrão Th2 (BOONSTRA et al., 2001; OVERBERGH et al., 2000; PENNA et al., 2005). $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ reduz a síntese de IFN- γ pela ligação do RXR no VDR, uma região silenciadora na região promotora do gene do IFN- γ (ALROY; TOWERS; FREEDMAN, 1995; CIPPITELLI; SANTONI, 1998). A $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ desencadeia a regulação positiva do fator de transcrição proteína GATA de ligação 3 (GATA3) que favorece o desenvolvimento da resposta por células Th2 (ZHU et al., 2006). Além disto, este hormônio facilita a indução de células T regulatórias (Treg) Foxp3⁺ (GREGORI et al., 2001; PENNA et al., 2005) e apresenta uma correlação positiva com a capacidade das células Treg na supressão da proliferação de células T (SMOLDERS et al., 2009).

A vitamina D também exerce efeito anti-inflamatório pela inibição da expressão de IL-6 (XUE et al., 2002), citocina fundamental para a diferenciação das células Th *naïve* em Th17, como também pela supressão da IL-12p70, IL-23p19, o que resulta em uma menor expressão de RNAm de IL-17 (DANIEL et al., 2007). A vitamina D tem um efeito direto nas células B e inibe produção de imunoglobulinas (LEMIRE et al., 1984). Além disso, a diferenciação de linfócitos B é interrompida *in vitro* quando exposta à $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ (CHEN et al., 2007).

Um aspecto relevante do metabolismo da vitamina D em macrófagos e células dendríticas refere-se ao fato de os mecanismos de regulação 1α -hidroxilase nestas células são diferentes dos mecanismos que regulam esta enzima no rim. Embora, nos rins, 1α -hidroxilase seja regulada principalmente pelo paratormônio (PTH), Ca^{2+} e $1,25(\text{OH})_2\text{D}$,

observa-se que, em macrófagos e células dendríticas, 1α -hidroxilase é predominantemente regulada por IFN- γ e lipopolissacarídeo (LPS) (VAN ETEN; MATHIEU, 2005).

Em macrófagos incubados com $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ e depois estimuladas com LPS, observa-se que a vitamina D aumenta a expressão do RNAm e a estabilidade do inibidor I κ B ($\text{I}\kappa\text{B}$) e diminuição da fosforilação de $\text{I}\kappa\text{B}$. O aumento dos níveis de $\text{I}\kappa\text{B}$ leva a uma redução na translocação nuclear de NF κ B, causando, com isto, diminuição da atividade desta célula. Tendo em vista o papel fundamental do NF κ B como um fator de transcrição de mediadores inflamatórios, é sugerido que a $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ tem ação anti-inflamatória em macrófagos (COHEN-LAHAV et al., 2006). Além disso, a $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ suprime a expressão de RNAm de receptores tipo *toll* (TLR)2 e TLR4 em monócitos em uma forma tempo e dose-dependentes (SADEGHI et al., 2006).

Outro mecanismo anti-inflamatório da vitamina D é mediado pela inibição da síntese da IL-6 pelos monócitos, que é o principal estímulo para a síntese de PCR pelo fígado (ROSTKOWSKA-NADOLSKA et al., 2010; ZHANG et al., 2012). Vários estudos que investigaram a relação entre a vitamina D e marcadores inflamatórios, como a PCR, mostraram resultados conflitantes. Liefwaard et al., (2015) analisaram 9649 participantes do *Rotterdam Study*, uma coorte prospectiva de base populacional, e mostraram uma associação inversa entre a vitamina D e PCR. Em indivíduos saudáveis, a VDD foi associada ao aumento da PCR e, após suplementação com vitamina D, os níveis de PCR foram normalizados (TIMMS et al., 2002). Outros estudos também encontraram uma associação inversa entre a vitamina D e PCR (AMER; QAYYUM, 2012; LIU et al., 2011). No entanto, a associação entre PCR e vitamina D não foi observada por outros autores (BJORKMAN; SORVA; TILVIS, 2009; HYPPOÖNEN et al., 2010; PARK et al., 2015; SHEA et al., 2008). A Figura 3 apresenta os principais efeitos da vitamina D na resposta imune inata e adaptativa.

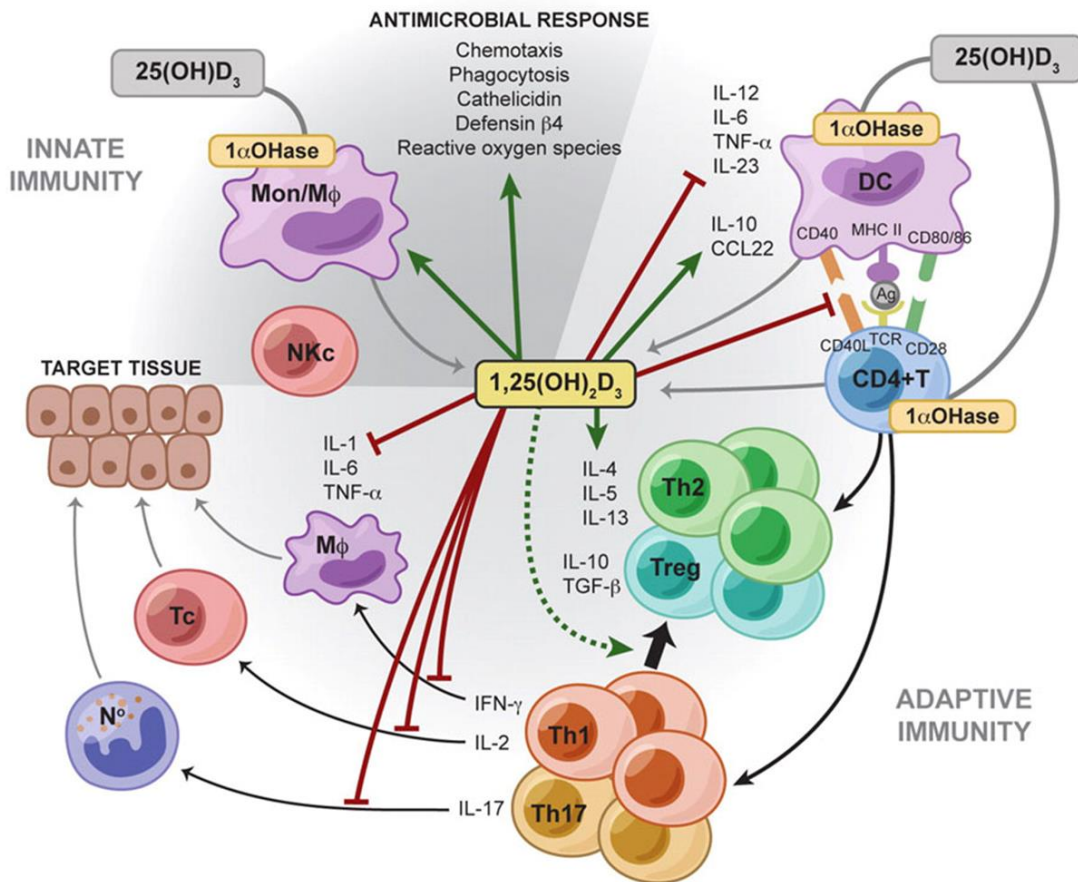


Figura 3 Vitamina D na resposta imune inata e adaptativa

Fonte: MATHIEU, C. (2011). Vitamin D and the immune system: Getting it right IBMS BoneKEy, 178–186, 1 .

1.2.3. Vitamina D e efeitos no sistema nervoso central

Os principais metabólitos da vitamina D estão presentes no LCR (BALABANOVA et al., 1984) e, de uma forma similar a outros neuroesteróides, podem atravessar a BHE (PARDRIDGE; SAKIYAMA; COTY, 1985). No entanto, a permeabilidade da BHE pode não ser necessária, pois as enzimas do citocromo P450 envolvidas com a conversão de 25(OH)D para 1,25(OH)₂D e 1,25(OH)₂D para 24,25(OH)₂D (CYP27B1 e CYP24A1, respectivamente) estão presentes no cérebro. Isto indica que o cérebro tem o potencial para sintetizar o metabólito ativo 1,25(OH)₂D. Em culturas primárias de células gliais de ratos, a expressão do RNAm de CYP24A1 foi aumentada de uma forma dose-dependente após a adição de 1,25(OH)₂D,

indicando que os níveis de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ podem ser regulados localmente no cérebro (NAVEILHAN et al., 1993).

A vitamina D tem mostrado ter funções tróficas gerais relacionadas com a diferenciação, maturação e crescimento neuronal. A primeira evidência que implica um papel neurotrófico para a vitamina D foi adquirida a partir de estudos *in vitro* que demonstraram que a síntese de fator de crescimento do nervo (NGF) foi estimulada pela $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ (PRÜFER et al., 1999); a relevância biológica deste fenômeno foi mais tarde confirmada em modelos *in vivo* de ratos adultos (BAAS et al., 2000). Além disto, demonstrou-se que a $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ regula positivamente a síntese de fator neurotrófico derivado da linha de células da glia (GDNF) e neurotrofinas (LANGUB et al., 2001; NAVEILHAN et al., 1996).

Evidências sugerem um papel neuroprotetor para a vitamina D e a sua administração ou dos seus metabólitos mostrou reduzir a lesão neurológica e/ou neurotoxicidade em modelos experimentais, incluindo a atenuação da área isquêmica cerebral em ratos pela regulação positiva de GDNF (BREWER et al., 2001) e a diminuição da morte neuronal em culturas induzidas por neurotoxicidade. Além disso, outros estudos demonstraram que o tratamento com $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ aumentou os níveis de antioxidantes, além de inibir a síntese de NO (óxido nítrico) pela óxido nítrico induzível (iNOS), reduzindo o estresse oxidativo e prevenindo a morte neuronal (GARCION et al., 1997, 1998, 1999; WANG et al., 2001). Recentemente, Huang e colaboradores (2015) analisaram o papel da vitamina D em culturas de células da glia e investigaram como a $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ poderia afetar a neuroinflamação e observaram que o tratamento com a $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ suprimiu a produção de EROS induzidos por LPS, reduziu a produção de IL-6 e a expressão da (iNOS) sem causar morte celular. Estes resultados sugerem que a vitamina D atenua a neuroinflamação inibindo a via de sinalização das MAPK em culturas de células da glia. A ativação da via MAPK por LPS inicia uma cascata caracterizada pela ativação de células da glia e um aumento de produção de mediadores inflamatórios, incluindo EROS, NO, citocinas e quimiocinas. Portanto, o controle da ativação das células da glia, como resultado da suplementação com vitamina D, pode ser usado como estratégia terapêutica integrativa para modular a neuroinflamação (HUANG et al., 2015). Estes resultados sugerem um efeito neuroprotetor importante para a forma ativa da vitamina D, ao diminuir os danos oxidativos para o SNC.

O VDR é expresso ao longo do tecido cerebral humano, incluindo cerebelo, tálamo, hipotálamo, gânglios basais, hipocampo, sistema límbico temporal e orbital (EYLES et al., 2005), assim como na maioria dos neurônios e células gliais (EYLES et al., 2005; PRÜFER et al., 1999). O tratamento com $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ previne a ruptura da BHE por mecanismos dependentes do VDR (WON et al., 2015) e a expressão adequada deste receptor é necessária para evitar a ativação descontrolada do NF κ B; dessa forma, a sinalização prejudicada do VDR leva a ativação de células endoteliais e aumento de interações entre leucócitos e endotélio vascular, gerando um acúmulo de células inflamatórias (BOZIC et al., 2015; WON et al., 2015).

Em adição ao papel da vitamina D no crescimento e sobrevivência dos neurônios, tem-se demonstrado que este hormônio e seus metabólitos modulam a síntese de uma variedade de neurotransmissores, incluindo acetilcolina, catecolaminas, serotonina e dopamina (GARCION et al., 2002). Portanto, a presença de metabólitos de vitamina D, enzimas de ativação e o VDR no cérebro indica que, tal como outros neuroesteróides, a vitamina D pode desempenhar um papel na manutenção e neuroproteção da função normal do cérebro.

1.2.4. Vitamina D e doença cardiovascular

O sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAA) mantém a resistência vascular devido a síntese de angiotensina II e a homeostase dos fluidos de volume extracelular (LI et al., 2002). Foi demonstrado que a vitamina D diminui a atividade do sistema RAA suprimindo a expressão da renina (WANG et al., 2008). A vitamina D regula os genes envolvidos na produção de renina, por meio de um elemento *cis*-DNA no promotor do gene da renina (LEE et al., 2008; LI, 2003), diminuindo a expressão do RNAm de renina e dos níveis séricos (LI et al., 2002). A síntese de renina leva a um aumento da produção de angiotensina II, que é um forte vasoconstritor, permitindo o desenvolvimento de hipertensão. Camundongos *knockout* para o VDR apresentam um aumento da expressão da renina e angiotensina II e desenvolvimento de hipertensão e hipertrofia cardíaca (CHEN et al., 2011; LI et al., 2002). *In vitro*, a vitamina D regula a expressão da renina independente do metabolismo do Ca^{2+} e calcitriol e suprime significativamente a transcrição de renina por um mecanismo mediado pelo VDR (LI et al., 2002).

Estudos epidemiológicos revelaram a VDD como um marcador de risco cardiovascular (PILZ et al., 2013) promovendo aterosclerose acelerada (NORMAN; POWELL, 2005; WANG et al., 2008) e eventos cardiovasculares posteriores (KUNADIAN et al., 2014). A deficiência crônica de vitamina D provoca hiperparatiroidismo secundário, aumentando a resistência à insulina, prejudicando a função das células β -pancreáticas, e permitindo o desenvolvimento de síndrome metabólica e diabetes (LEE et al., 2008; MAKI et al., 2009).

Níveis baixos de vitamina D foram associados com o aumento da prevalência de hipertensão arterial (ALMIRALL et al., 2010; MARTINS et al., 2007; NIGWEKAR; THADHANI, 2013; PILZ et al., 2009). Estudos clínicos demonstraram, uma relação dose-resposta inversa entre $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ e pressão arterial ou a atividade da renina em pacientes hipertensos e normotensos (BURGESS; HAWKINS; WATANABE, 1990; KRISTAL-BONEH et al., 1997; RESNICK; MÜLLER; LARAGH, 1986).

A vitamina D regula a resposta endotelial à lesão (CAPRIO; MAMMI; ROSANO, 2012; TARCIN et al., 2009), restaura o relaxamento do endotélio prejudicado em artérias e normaliza as proteínas relacionadas ao estresse oxidativo que danificam o vaso (DONG et al., 2012). Além disso, também ajuda a regular a coagulação sanguínea diminuindo a formação de trombos e da atividade do fator tissular (AIHARA et al., 2004). *In vitro*, células musculares humanas mostram que a ativação do VDR pela $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ conduz a uma regulação negativa da expressão de proteínas trombogênicas (WU-WONG; NAKANE; MA, 2007). Pacientes hipertensos com VDD foram associados com um risco duas vezes maior de eventos cardiovasculares, incluindo infarto do miocárdio, angina, AVEi, AIT e insuficiência cardíaca (WANG et al., 2008).

Recentemente, Durup e colaboradores (2015), em estudo de coorte, analisaram a associação entre os níveis de $25(\text{OH})\text{D}$ e mortalidade por doenças cardiovasculares, como o AVE e infarto agudo do miocárdio em mais de 200 mil indivíduos. Após sete anos de seguimento, 5454 indivíduos morreram de doenças cardiovasculares, incluindo 1574 por AVE e 702 por infarto agudo do miocárdio. Os níveis de $25(\text{OH})\text{D}$ próximos a 28 ng/mL foram associados com o menor risco de mortalidade por doenças cardiovasculares. Comparada a esse nível, o risco de mortalidade por doença cardiovascular foi de 2,0 (IC 95% 1,8-2,1) para níveis abaixo de 5 ng/mL. Para níveis acima de 50 ng/mL, o risco de mortalidade por doença cardiovascular foi de 1,3 (IC 95% 1,2-,4), com risco semelhante para homens e mulheres. Estes autores demonstraram uma associação não-linear entre os níveis de $25(\text{OH})\text{D}$ e

mortalidade, em que níveis elevados e diminuídos de 25(OH)D foram associados com aumento da mortalidade por AVE. A menor taxa de mortalidade por AVE foi observada em cerca de 30 ng/mL, ajustado para idade, sexo e estação do ano. Estes resultados devem ser levados em consideração em relação à importância para definir os níveis adequados de vitamina D que podem ser suficientes para suas importantes funções biológicas.

1.2.4.1. Vitamina D e o acidente vascular encefálico isquêmico

Vários estudos associaram baixos níveis de 25(OH)D ao AVEi (BRØNDUM-JACOBSEN et al., 2013; CHAUDHURI et al., 2014; MICHOS et al., 2012; SUN et al., 2012; TU et al., 2014). No entanto, outros autores não encontraram diferenças da 25(OH)D entre pacientes com AVEi e grupo controle (BOLLAND et al., 2010; DRECHSLER et al., 2010; GUPTA et al., 2014; MAJUMDAR et al., 2015).

Do mesmo modo, a frequência de VDD em pacientes com AVEi varia em diferentes populações e os estudos apresentam resultados conflitantes, devido a diferentes fatores genéticos, condições geográficas, físicas e culturais, diferentes critérios de definição de VDD e metodologias de diagnóstico.

Brøndum-Jacobsen e colaboradores (2013) verificaram que os indivíduos com níveis menores de 10 ng/mL de 25(OH)D apresentaram maior risco de AVEi comparados com indivíduos com níveis suficientes de vitamina D (VDS) durante 21 anos de seguimento. Sun e colaboradores (2012) avaliaram 464 mulheres com AVEi e 464 mulheres sem histórico de AVEi e demonstraram associação entre os baixos níveis de 25(OH)D (<10 ng/mL) e maior incidência de AVEi independente do estilo de vida e fatores dietéticos. Esta observação foi confirmada por uma meta-análise realizada pelo mesmo grupo de pesquisadores que analisaram seis outros estudos prospectivos que, em geral, também demonstraram associação inversa entre os níveis de 25(OH)D e AVEi. O *Third National Health and Nutrition Examination Survey* avaliou os níveis de 25(OH)D e fatores de risco para doença cardiovascular no período de 1988–1994 e demonstrou que níveis <15 ng/mL de 25(OH)D estão associados com AVEi fatal somente em indivíduos caucasianos (MICHOS et al., 2012).

Alguns estudos demonstraram a associação entre vitamina D e a incapacidade funcional de pacientes com AVEi agudo. Baixos níveis de 25(OH)D mostraram ser um preditor de incapacidade funcional na alta hospital e mortalidade após 1 ano (DAUBAIL et al., 2013, 2014; WANG et al., 2014). Park e colaboradores (2015) analisaram 818 pacientes

com AVEi e demonstraram que os pacientes com vitamina D acima de 30 ng/mL apresentaram maiores níveis de triglicerídeos, colesterol total e menor incapacidade após três meses quando comparados com os outros subgrupos com diferentes status vitamina D.

Vários estudos analisam a relação entre prognóstico do AVEi e níveis de vitamina D; no entanto, até presente data, apenas dois estudos avaliaram o papel deste hormônio na resposta inflamatória em pacientes com AVEi. Tu e colaboradores (2014) demonstraram que os níveis de 25(OH)D estão inversamente correlacionados com a PCR. No entanto, Park e colaboradores (2015) não encontraram associação entre níveis de 25(OH)D e PCR e leucócitos periféricos; estes resultados contraditórios podem ser explicados, em parte, pelos diferentes critérios de inclusão dos pacientes que eram de até sete dias após o evento isquêmico. Por outro lado, apenas dois estudos dosaram a forma ativa da vitamina D, 1,25(OH)₂D. Baixos níveis de 1,25(OH)₂D foram associados com um maior risco de AVEi durante 10 anos de seguimento (MARNIEMI et al., 2005) e foram considerados como um fator preditivo independente para AVEi fatal (PILZ et al., 2008).

2. JUSTIFICATIVA

Os dados descritos na literatura sugerem que a resposta inflamatória envolvida na fase aguda da isquemia pode representar um fator importante para o desenvolvimento e prognóstico dos pacientes com AVEi. Sabe-se que a vitamina D possui atividade anti-inflamatória e a deficiência deste hormônio modifica indiretamente o risco de AVEi pela associação com fatores de risco clássicos.

As justificativas do presente estudo incluem a variabilidade da frequência de VDD em pacientes com AVEi observada em diferentes populações, os resultados conflitantes em relação ao papel da vitamina D na susceptibilidade ao AVEi assim como no prognóstico dos pacientes após o evento isquêmico.

Até presente data, não temos registro de estudos sobre a frequência da deficiência deste hormônio nos pacientes com AVEi na população brasileira, assim como sua relação com marcadores inflamatórios e de prognóstico nesta população.

Diante deste cenário, fica evidente a importância da vitamina D nos processos lesivos envolvidos na fisiopatologia do AVEi como inflamação e morte cerebral, o que a torna um atraente marcador laboratorial que possa ser utilizado na avaliação da susceptibilidade e prognóstico do evento isquêmico.

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo Geral

Avaliar a associação entre os níveis de vitamina D e o AVEi, marcadores inflamatórios e prognóstico a curto prazo em pacientes com AVEi agudo

3.2. Objetivos Específicos

- Descrever as características demográficas, antropométricas, epidemiológicas e clínicas dos pacientes com AVEi agudo e do grupo controle;
- Determinar os níveis séricos de 25(OH)D e o status de vitamina D em pacientes com AVEi e o grupo controle;
- Avaliar a resposta inflamatória em pacientes com AVEi agudo e o grupo controle;
- Determinar a associação entre as características demográficas, antropométricas, epidemiológicas, clínicas, marcadores inflamatórios e a incapacidade funcional nos pacientes com AVEi agudo com o status da vitamina D dos mesmos;
- Avaliar a associação dos níveis séricos de 25(OH)D com o prognóstico dos pacientes após três meses de seguimento.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Aspectos Éticos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina (UEL) (CAAE 0176.0.268.000-10, Parecer CEP/UEL 181/2010, Anexo 1). Os indivíduos foram convidados a participar voluntariamente da pesquisa e um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) foi obtido dos indivíduos envolvidos na pesquisa ou de seus responsáveis (Apêndice 1A e 1B).

4.2. Delineamento

Foi realizado um estudo observacional, descritivo, prospectivo de prognóstico, com os delineamentos caso-controle e de seguimento.

4.3. População

Foram convidados a participar do estudo 288 pacientes com provável diagnóstico de AVEi agudo, adultos, de ambos os sexos, que deram entrada no Pronto Socorro do Hospital Universitário da UEL (HU/UEL), em Londrina, Paraná. O convite foi realizado de forma consecutiva, no período de janeiro de 2013 a janeiro de 2015. Neste mesmo período, foram convidados indivíduos adultos, de ambos os sexos, sem histórico de AVE e infarto agudo do miocárdio, entre os candidatos a doadores de sangue do Hemocentro Regional de Londrina e da população em geral para constituir o grupo controle.

4.4. Amostra

Trata-se de uma amostra consecutiva, de conveniência de tempo e local, com a inclusão, prospectivamente, de 168 pacientes com AVEi agudo, diagnosticados pelo exame clínico e tomografia de crânio (TC) de crânio e/ou ressonância magnética nuclear (RNM). O AVEi agudo foi diagnosticado como déficit focal ao exame neurológico, com ou sem distúrbio de consciência; início súbito, agudo ou rapidamente progressivo que persistiu por >24 horas

confirmado por TC de crânio e/ou RNM. Os subtipos de AVEi foram classificados segundo os critérios definidos pelo *Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment* (TOAST), que inclui 5 categorias dependendo dos dados clínicos, dos exames laboratoriais e de imagem, tais como LAAS, CEI, LAC, ODE e UDE (ADAMS et al., 1993).

A avaliação do estado de incapacidade funcional foi realizada pela escala de Rankin modificada (mRS) (BONITA; BEAGLEHOLE, 1988) aplicada em até oito horas da admissão no hospital (*baseline*). Os pacientes foram prospectivamente acompanhados após três meses do evento isquêmico, por meio de consulta ambulatorial ou entrevista telefônica com o paciente ou o mais próximo dele ou responsável, quando apropriado (OH et al., 2011). Neste momento, foram coletados dados sobre os cuidados médicos recebidos durante o período de seguimento, o estado funcional após o AVEi ou a mortalidade, de acordo com o instrumento descrito no Apêndice 1C. No caso de óbito, o avaliador solicitava a data do mesmo e se foi em decorrência do AVEi ou por outra causa não relacionada ao evento isquêmico.

O grupo controle foi composto de 118 indivíduos selecionados entre candidatos a doadores de sangue fidelizados do Hemocentro Regional de Londrina e indivíduos da população geral de Londrina. Os indivíduos deveriam apresentar ausência de reatividade em todos os testes sorológicos realizados na triagem de doadores de sangue, como anticorpos contra o vírus da imunodeficiência humana (HIV) tipos 1 e 2, anticorpos contra o vírus da hepatite C (HCV), antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBV), anticorpos contra o antígeno *core* do HBV, anticorpos contra o vírus linfotrópico de células T humanas tipos I e II (HTLV I/II), anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi* e teste não treponêmico para sífilis, além de não terem história de evento isquêmico.

Foram coletados dados demográficos (idade, sexo e etnia), epidemiológicos como fatores de risco associados ao AVEi (hipertensão, sedentarismo, tabagismo, dislipidemia e diabetes), antropométricos [peso, altura e índice de massa corpórea (IMC)] e clínicos [pressão sanguínea sistólica (PAS) e pressão sanguínea diastólica (PAD)] e medicamentos em uso no período que antecedeu o evento isquêmico.

PAS \geq 130 mmHg e PAD \geq 90 mmHg ou uso de anti-hipertensivo foram os critérios considerados para definir hipertensão (JAMES et al., 2014). Presença de diabetes foi definida como glicose em jejum \geq 100 mg/dL, e não-jejum \geq 200 mg/dL e/ou o uso de medicamentos antidiabéticos (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014). Dislipidemia foi

definida pela presença de uma ou mais das concentrações anormais de lipídeos no soro, como colesterol total ≥ 200 mg/dL, LDL ≥ 130 mg/dL; colesterol de lipoproteína de alta densidade (HDL) < 40 mg/dL (NATIONAL CHOLESTEROL EDUCATION PROGRAM EXPERT PANEL ON DETECTION, EVALUATION, 2002).

Os dados foram coletados pela aplicação de um questionário padrão (Apêndice 1C), respondidos pelo paciente ou por seus responsáveis e pelo grupo controle. Os dados foram, também, obtidos por meio de consulta aos prontuários médicos e à base de dados LABHOS do Laboratório de Análises Clínicas (LAC) do HU/UEL e do Hemocentro Regional de Londrina. As medidas antropométricas avaliadas foram peso corporal (kg) e altura (m), obtidas, por interrogatório, durante a aplicação do questionário. O IMC foi calculado como peso (kg) dividido pela altura (m) ao quadrado e expresso em kg/m^2 . PAD e PAS foram obtidas no período da admissão pelo uso de aparelho digital devidamente calibrado e expressas em mmHg.

4.5. Critérios de Exclusão

Foram excluídos 120 pacientes pelos seguintes critérios: recusaram-se a participar do estudo; apresentando processo inflamatório, autoimune ou infeccioso; pacientes em uso crônico de corticosteroides ou imunossupressores; portadores de doença renal crônica, hepatopatia crônica, neoplasias, doença de Alzheimer, doença de Parkinson; os que apresentaram AIT, AVE hemorrágico, infarto agudo do miocárdio; pós-operatório imediato; trauma nos últimos 30 dias, pacientes com dados incompletos ou que não tinham amostra biológica para as análises laboratoriais previstas.

4.6. Exames Laboratoriais

Amostras de sangue periférico, com e sem condições de jejum para os pacientes e jejum para o grupo controle, foram coletadas nas primeiras 24 horas da admissão no hospital pelos participantes do projeto, segundo a requisição de exames laboratoriais padronizada pelo hospital. Foram coletados 10 mL em tubo de coleta a vácuo sem anticoagulante e dois tubos de 10 mL com anticoagulante EDTA. O material foi encaminhado imediatamente ao laboratório para registro, processamento e armazenamento das

amostras. Plasma e soro foram obtidos após centrifugação (10 min 2500 rpm) e armazenados em *freezer* -80 °C até o momento das análises quando as amostras não eram analisadas no mesmo dia. Todos os pacientes e controles e suas respectivas amostras foram identificados por número e letra para garantir o anonimato e confidencialidade dos indivíduos e dos resultados obtidos.

Os exames laboratoriais que fazem parte da rotina no atendimento dos pacientes com AVEi no HU/UEL foram realizados nos setores de Exames Hematológicos, Bioquímica Clínica e Imunologia Clínica do LAC/HU, utilizando-se de métodos padronizados e reagentes disponíveis comercialmente. Foram considerados os valores de referências estabelecidos pelos fabricantes dos reagentes utilizados.

4.6.1. Vitamina D

Os níveis séricos de 25(OH)D foram determinados por imunoensaio de quimiluminescência por micropartículas (Architect i2000[®], Abbott Laboratório, Abbott Park, IL, USA). De acordo com os níveis séricos de vitamina D, os grupos de pacientes e controles foram classificados em: vitamina D suficiente (VDS) quando os valores eram >30 ng/mL; vitamina D insuficiente (VDI) quando valores eram $> 20 \leq 30$ ng/mL e VDD quando os valores eram <20 ng/mL (HOLICK, 2007).

4.6.2. Marcadores inflamatórios

Os exames de contagem total de leucócitos periféricos (células/mm³), contagem de plaquetas (células/mm³) e VHS (mm/1^ahora) foram realizados por método automatizado; a dosagem dos níveis plasmáticos de citocinas TNF- α , IL-6 e IL-10 foram realizadas por método imunoenzimático (ELISA, eBioscience, San Diego, Califórnia, USA), com limite de detecção de TNF- α , IL-6 e IL-10 definido como 2,0 ng/mL, 1,0 ng/mL e 2,0 ng/mL respectivamente, de acordo com o fabricante.

Os níveis séricos de usPCR foram avaliados imunoensaio de micropartícula com quimioluminescência (Architech™, Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA), com sensibilidade analítica de 0,175 mg/L. Os resultados foram categorizados em < 5 mg/L e ≥ 5 mg/L para análise estatística. Os níveis séricos de ferritina foram avaliados por imunoensaio

de micropartícula com quimioluminescência (Architech™, Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA).

4.7. Análise Estatística

As análises de contingência (teste χ^2) foram utilizadas para verificar as associações entre as variáveis categóricas e grupos de diagnóstico. Foram avaliadas as diferenças das variáveis contínuas entre os grupos utilizando análises de variância (ANOVA), seguidas pelo teste de Tukey para examinar as comparações múltiplas entre médias de grupos. As variáveis categóricas foram expressas em número absoluto (n) e o percentual (%), e as variáveis contínuas foram expressas como média \pm erro padrão da média (SEM). Foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov para avaliar a normalidade de distribuição das variáveis. Transformações logarítmicas (ln) de dados contínuos foram utilizadas nas análises quando as variáveis não apresentaram distribuição normal ou quando havia heterogeneidade da variância (conforme avaliado com o teste de Levene). A associação entre o status de vitamina D e o AVEi foi avaliada usando análise de regressão logística binária em diferentes modelos, controlados para covariáveis que poderiam confundir a associação de interesse. *Odds ratio* (OR) e intervalo de confiança (IC) de 95% foram calculados. Análises de regressão logística multinomial graduais automáticas foram utilizadas para definir as variáveis significativas (IC de 95%) do status de vitamina D em AVEi agudo utilizando as variáveis com valor de $p < 0,1$. Teste de correlação de Spearman foi utilizado para avaliar a correção dos níveis de 25(OH)D e os escores de mRS após três meses do evento isquêmico. A análise estatística foi realizada com SPSS para Windows, versão 20.0 (SPSS Inc., CHIGADO, IL, EUA). A significância estatística foi definida como $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

Os resultados obtidos neste trabalho foram apresentados e discutidos em um artigo científico submetido à revista Journal of the Neurological Sciences, com fator de impacto 2,535.

VITAMIN D DEFICIENCY IS ASSOCIATED WITH ACUTE ISCHEMIC STROKE, C-REACTIVE PROTEIN, AND SHORT-TIME OUTCOME

Daniela Frizon Alfieri¹; Márcio Francisco Lehmann²; Sayonara Rangel Oliveira¹; Tamires Flauzino¹; Francieli Delongui¹; Maria Caroline Martins de Araújo³; Isaias Dichi⁴; Vinícius Daher Delfino⁴, Andréa Name Colado Simão⁵; Edna Maria Vissoci Reiche⁵.

¹Postgraduate Program, Health Sciences Center, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil;

²Department of Clinical Surgery, Health Sciences Center, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil;

³Medicine School, Health Sciences Center, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil;

⁴Department of Clinical Medicine, Health Sciences Center, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil;

⁵Department of Pathology, Clinical Analysis and Toxicology, Health Sciences Center, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil;

Corresponding author: Edna Maria Vissoci Reiche, Department of Pathology, Clinical Analysis and Toxicology, Health Sciences Center, Londrina State University, Av. Robert Koch, 60, CEP 86.038-440, Londrina, Paraná, Brazil. Phone/FAX number: + 55-43-3371-2619. e-mail: reiche@sercomtel.com.br

ABSTRACT

Objective: The aim of this study was to investigate whether vitamin D deficiency (VDD) is associated with acute ischemic stroke, inflammatory markers, and short-time outcome.

Methods: 168 acute ischemic stroke patients and 118 subjects were included. The modified Rankin Scale (mRS) was applied up to eight hours of stroke and after three-month follow-up, and blood samples were obtained up to 24 hours of stroke to evaluate serum levels of 25-hydroxivitamin D [25(OH)D] and inflammatory markers. Vitamin D status classified the individuals in sufficient (VDS ≥ 30 ng/mL), insufficient (VDI 20-29.9 ng/mL), and deficient (VDD < 20.0 ng/mL).

Results: Patients presented lower levels of 25(OH)D and higher frequency of VDD (43.45% vs. 5.08%, OR: 18.40, 95% CI: 6.14-55.175, $p < 0.0001$), and higher inflammatory markers than controls ($p < 0.05$). Patients with VDD presented higher high sensitivity C-reactive protein (hsCRP) levels than those with VDS ($p = 0.043$); those with poor outcome presented lower 25(OH)D levels than those with good outcome ($p < 0.008$); moreover, 25(OH)D levels were negatively correlated with mRS after three-month follow-up ($r = -0.239$, $p = 0.005$)

Conclusion: The associations between VDD and higher hsCRP levels in acute ischemic stroke, and between 25(OH)D levels and poor outcome at short-time of acute ischemic stroke patients suggest the important role of vitamin D in the inflammatory response and pathophysiology of this ischemic event.

Keywords: stroke; vitamin D; inflammation; C-reactive protein; vitamin D deficiency

1 INTRODUCTION

Stroke is sudden onset of focal neurological deficit and a major cause of disability and mortality worldwide [1]. Acute ischemic stroke has a heterogeneous etiology caused by unmodifiable risk factors, such as genetic, age, and sex, as well as by modifiable risk factors including hypertension, diabetes mellitus (DM), dyslipidemia, sedentary lifestyle, and smoking [2]. Cerebral ischemic injury is associated with the induction of a series of inflammatory events, including the infiltration of circulating immune cells and activation of microglia, astrocytes, and endothelial cells [3–5].

Previous studies have reported that vitamin D deficiency (VDD) is associated with cardiovascular disease events and mortality [6–9]. VDD has been associated with an increased prevalence of individual cardiovascular risk factors, such as endothelial dysfunction [10], DM [11], dyslipidemia [12], hypertension [13], and atrial fibrillation [14], and is considered an independent factor for the occurrence of acute ischemic stroke [15–19]. Moreover, hypovitaminosis D was independently associated with larger ischemic infarct volume [20,21] and poor outcome [22].

Bone and skeletal muscle, brain, prostate, breast and colon tissues as well as immune cells have a vitamin D receptor (VDR) and respond to the active form 1,25 dihydroxyvitamin D [1,25(OH)₂D] [23]. Therefore, apart from its classical effects on bone and skeletal homeostasis [24], vitamin D has been associated with the regulation of inflammation through several mechanisms, including inhibiting prostaglandin, mitogen-activated protein kinase (MAPK) and nuclear factor kappa B (NF-κB) pathways [25–27], downregulation of pro-inflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor (TNF)-α, interleukin (IL)-6, IL-12, and interferon (IFN)-γ, and upregulation of anti-inflammatory T

regulatory (Treg) and Th2 cells and their cytokines [28–30]. All these potential mechanisms may explain the link between vitamin D and cardiovascular diseases and stroke, as well.

The association between vitamin D and acute ischemic stroke has been evaluated in different populations; however, conflicting results were verified. While some studies reported an association between low levels of vitamin D and stroke [16–20,22,31], as well as its relationship with outcome and prognosis [18,20–22,32–34], others have not found the former association [35–39].

Moreover, only two of these previous studies evaluated the association of vitamin D and inflammatory markers in patients with acute ischemic stroke [20,22] and also showed conflicting results. To clarify this issue, the aim of the present study was to evaluate the association between vitamin D levels and acute ischemic stroke, as well as with inflammatory markers, and short-time outcome in these patients.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Study subjects

The protocol was approved by the Institutional Research Ethic Committee of the State University of Londrina, Paraná State, Brazil (CAAE 0250.0.268.000-11), and a written consent form was obtained from all of the individuals. A total of 168 acute ischemic stroke patients diagnosed with focal neurological signs or symptoms thought to be of vascular origin that persisted for >24 h, confirmed by brain computed tomography (CT) and clinic examination in baseline conditions were consecutively recruited during January 2013-2015 from the Emergency Room of the University Hospital of State University of Londrina. The acute ischemic stroke subtypes were classified according to the TOAST criteria [40]. As controls, 118 individuals from the general population of Londrina, controlled for age, sex,

ethnicity, and body mass index (BMI), and with no history of stroke/ myocardial infarction were enrolled in the same period. Patients and controls with fever, acute infections, hematological, inflammatory or autoimmune diseases, with renal or liver failure, cancer, cerebral hemorrhage, and those using calcium and/or vitamin D therapy were excluded. Demographic, epidemiological, anthropometric, and clinical data with traditional stroke risk factors and the use of any therapeutic drugs before the inclusion in this study were obtained using a standard questionnaire at the admission of the individuals. The anthropometric measures were verified by body weight and height reported by the individuals, when it was possible, or by the patient's family. BMI was calculated as weight (kg) divided by height (m) squared. The ethnicity was self-reported as Caucasian and non-Caucasian (Asiatic, Black, and Afro-Brazilian) [41]. Baseline blood pressure evaluations were obtained using digital apparatus properly calibrated, and the mean of these measurements was used in the analysis. Systolic blood pressure (SBP) ≥ 130 mmHg and diastolic blood pressure (DBP) ≥ 90 mmHg or the use of antihypertensive was an indication of hypertension [42]. Diabetes mellitus was defined as a fasting serum glucose ≥ 126 mg/dL, a non-fasting serum glucose ≥ 200 mg/dL and/or use of anti-diabetic medication [43]. Dyslipidemia was defined by the presence of one or more than one of the abnormal serum lipid concentration: total cholesterol ≥ 200 mg/dL, low-density lipoprotein cholesterol ≥ 130 mg/dL; high-density lipoprotein cholesterol < 40 mg/dL, triglycerides > 150 mg/dL [44]. The functional impairment was evaluated using the modified Rankin Scale (mRS) [45] applied within the first 24 h of admission (baseline) and the values were used to categorize the patients as mild functional impairment (mRS < 3) and moderate/severe functional impairment (mRS ≥ 3). The mRS was also applied after three-month follow-up through clinical examination or using telephone

interviews with the patients or their relatives [32,46] and the values were used to categorize the patients as good outcome (mRS <3) and poor outcome (mRS ≥3) [22].

2.2 Blood samples

Peripheral blood samples were collected within the 24h of the admission, under non-fasting state, with and without EDTA as anticoagulant. Plasma and serum samples were immediately separated by centrifugation (2,500 rpm for 15 min) and stored in aliquots at -80 °C until analyzes.

2.3 Vitamin D status

Serum levels of 25 dihydroxyvitamin D [25(OH)D] were determined using chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA) (Architect, Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA). Vitamin D sufficient (VDS) status was defined with values ≥30.0 ng/mL, vitamin D insufficient (VDI) status was defined with values from 20-29.9 ng/mL and VDD with values <20.0 ng/mL [23].

2.4 Inflammatory markers

Plasma TNF- α , IL-6, and IL-10 levels were evaluated using a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA, eBioscience, San Diego, California, USA). White blood cell and platelet counts and erythrocyte sedimentation rate (ESR) were determined using hematological autoanalyzers. Serum high sensitivity C-reactive protein (hsCRP) and ferritin were determined using CMIA (Architect, Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA).

2.5 Statistical analyses

Analyses of contingency tables (χ^2 test) were employed to check the associations between categorical variables and diagnostic groups. We assessed the differences in continuous variables between groups using analyses of variance (ANOVAs) followed by the Tukey test to examine multiple comparisons among subgroup means, when appropriated. Categorical variables were expressed as absolute number (n) and percentage (%) and continuous variables were expressed as mean \pm error standard of mean (SEM). The Kolmogorov-Smirnov test was used to assess normality of distribution. Logarithmic (Ln) transformation of continuous data was used in the analyses when the variables were not normally distributed or when there was heterogeneity of variance (as assessed with the Levene test). The association between vitamin D status and acute ischemic stroke was evaluated using binary logistic regression analysis with controlling covariates with could have confounded the association of interest in different models. Automatic stepwise multinomial logistic regression analyses was used to define the significant associations (with OR and 95% CI) of vitamin D status in acute ischemic stroke using the variables with p value <0.10 . Odds ratio (OR) and 95% confidence interval (95% CI) were also calculated. The Spearman rank correlation was evaluated between serum 25(OH)D and mRS after three-month follow-up. The statistical analysis was performed with SPSS for Windows, version 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) and significance was defined as $p < 0.05$.

3 RESULTS

Table 1 shows the baseline characteristics and vitamin D status in patients and controls. As would be expected, patients and controls did not differ in the controlled variables, such as sex, age, ethnicity, and BMI. Men (96/57.1%) and Caucasians (132/78.6%)

were more frequent among the patients, and the mean age (\pm SEM) was 67.9 ± 1.0 years. Patients presented higher frequency of smoking ($p < 0.0001$), hypertension ($p < 0.0001$), DM ($p = 0.025$), and VDD than controls ($p < 0.001$). While 73 (43.5%) patients presented VDD, only 6 (5.08%) controls presented this vitamin D status ($p < 0.0001$). The mean (\pm SEM) of 25(OH)D was 22.54 ng/mL (0.82) in patients and 30.37 ng/mL (0.80) in controls ($p < 0.0001$). The outcome of ANOVAs performed on the different inflammatory markers showed that patients presented higher ESR ($p = 0.002$), total peripheral leukocyte counts ($p < 0.0001$), hsCRP ($p < 0.0001$), ferritin ($p = 0.002$), IL-6 ($p < 0.0001$), and TNF- α ($p = 0.014$) than controls.

Further, some results of the univariate statistical analyses were used to delineate the significant explanatory variables as determinants of independent association between vitamin D status and diagnostic groups in subsequent models of logistic regression analyses (Table 2). With model 1, controlled for age, sex, BMI, and ethnicity, VDD remained associated with acute ischemic stroke (OR 16.32, 95% CI: 5.89-45.17; $p < 0.0001$); with model 2, that included model 1 and smoking status, this association remained significant (OR 16.07, 95% CI: 5.77-44.70; $p < 0.0001$); with model 3, that included model 2 and hypertension (OR 18.12, 95% CI: 6.12-53.63; $p < 0.0001$), also remained significant; when DM was added into model 4, the odds was also significant (OR 17.69, 95% CI: 5.93-52.75; $p < 0.0001$); with model 5, that included dyslipidemia, the association also remained significant (OR 17.78, 95% CI: 5.96-53.01; $p < 0.0001$). Finally, with model 6, after additional adjustment for drugs, including use of antihypertensive, hypoglycemic, and hypolipemiant, the VDD remained associated with acute ischemic stroke (OR 18.40, 95% CI: 6.13-55.17; $p < 0.0001$).

Among stroke subtypes, 58 (34.5%) patients had large artery atherosclerosis stroke (LAAS), 53 (31.6%) lacunar infarct (LAC), 26 (15.5%) cardio-embolic infarct (CEI), 5 (3.0%) other determined etiology (ODE), and 26 (15.5%) undetermined etiology (UDE);

however there were no statistically significant differences between stroke subtypes in relation to vitamin D status ($p=0.861$). Moderate/severe functional impairment on admission was found in 124 (79.0%) patients with a mean (\pm SEM) mRS score of 3.73 (0.10), and after three-month follow-up, 90 (67.2%) patients had poor outcome, with a mean (\pm SEM) mRS of 3.74 (0.21) (data not shown).

The characteristics of the patients stratified by their vitamin D status are summarized in table 3. Patients with VDD status were more likely to be female, older, and with higher mRS at baseline than those with VDI and VDS status ($p=0.003$, $p=0.008$, and $p=0.047$, respectively). Moreover, ESR levels were higher in patients with VDD than those with VDS ($p=0.016$) and serum levels of hsCRP and IL-6 were higher in patients with VDD than in patients with VDI and VDS ($p=0.002$ and $p=0.001$, respectively) (Table 4). After multinomial logistic regression analysis with these subgroups of patients as dependent variable and those variables with p -value <0.10 described in tables 3 and 4 as explanatory variables, VDD status remained significantly associated with sex and hsCRP serum levels of the patients ($p=0.023$ and $p=0.043$, respectively) (Table 5).

When we analyzed the association between outcome of the patients after three-month follow-up and 25(OH)D serum levels, those with poor outcome presented lower 25(OH)D levels than those with good outcome (Figure 1A). After logistic regression analysis adjusted by age, sex, and mRS baseline, the 25(OH)D levels remained significantly associated with poor outcome ($p=0.008$). Moreover, serum 25(OH)D levels showed a negative correlation with the mRS at three-month follow-up ($r=-0.239$, $p=0.005$) (Figure 1B).

4 DISCUSSION

The main finding of the present study is that VDD can be considered an independent marker associated with acute ischemic stroke. Even after controlling for the classical variables associated with the occurrence of this ischemic event, such as age, sex, ethnicity, BMI, smoking status, presence of diabetes, hypertension, dyslipidemia and drugs used previously of the ischemic event (antihypertensive, hypoglycemic and hypolipemiant), patients with VDD were 18.40 more likely to present acute ischemic stroke when compared to those with VDS status. In addition, VDD status was independently associated with higher levels of hsCRP and short-time outcome in patients with acute ischemic stroke.

The association between low levels of 25(OH)D and ischemic stroke is consistent with previous studies carried out in other populations worldwide [15,16,18,19]. Studies in both animal and humans demonstrated that vitamin D decreases renin-angiotensin-aldosterone system activity, regulating the genes involved in renin production [47]. VDD has been associated with increased prevalence of hypertension [13,48], endothelial dysfunction in healthy subjects and replacement of vitamin D has shown favorable effects on endothelial function [10]. Moreover, vitamin D produced a significant reduction in lipid profile, CRP, and adhesion molecules in an experimental model [49], suggesting beneficial effects on inflammation and the atherosclerotic process. However, other studies have not found association between VDD and stroke [35–39].

The 25(OH)D is widely viewed as the superior biomarker for assessing vitamin D status, because its half-life is higher than 1,25(OH)₂D (15 days vs 15h) [50]. Only two studies measured the 1,25(OH)₂D, and low levels of this active form were associated with high risk for stroke after 10 years follow-up [17] and was also considered an independent predictor for fatal stroke [15].

The association between VDD and high levels hsCRP in patients with ischemic stroke obtained in the present study can be explained by the anti-inflammatory activities of vitamin D, including the inhibition of the IL-6 synthesis by monocytes, which is the primary stimulus for CRP production in the liver [28,51]. The first cells responding to brain ischemia are glial cells, particularly microglia, with transcription of early pro-inflammatory cytokines, such as IL-1 β , TNF- α , and IL-6, which are able to activate additional inflammatory pathways leading to induction of the positive acute phase proteins, including CRP. Only two studies analyzed the vitamin D with inflammatory markers in patients with ischemic stroke. Similarly to the results obtained in the present study, Tu et al (2014) showed that levels of 25(OH)D were inversely correlated with CRP [20], whereas, Park et al (2015) did not find this association in patients with acute ischemic stroke [22]; these conflicting results can be explained, in part, by the inclusion criteria of patients used by these authors that were up to seven days after the ischemic event.

The increased serum levels of hsCRP have been considered a marker for atherothrombotic disease and may reflect the level of the inflammatory activity in atherosclerotic plaques [52]. Serum hsCRP levels are a valuable and sensitive indicator of initial and recurrent ischemic stroke [53–56]. It has been demonstrated that CRP acts on endothelial cells inducing tissue factor expression and promotes smooth muscle and endothelial cell proliferation [57]. Moreover, CRP is a chemoattractant for monocytes [58], upregulates adhesion molecules [59], modulates nitric oxide bioavailability [60], increases plasminogen activator inhibitor–1 expression [61], and induces several inflammatory genes via NF- κ B activation in endothelial human cells [62]. Therefore, CRP is directly associated with a proatherothrombotic phenotype in the vessel wall.

Prospective studies with apparently healthy individuals have proposed that, regardless of other cardiovascular risk factors, increased plasma hsCRP levels are significant predictors of ischemic stroke and transient ischemic attack (TIA) [63]. Moreover, acutely elevated CRP showed significant and positive associations with unfavorable short-outcome [56,64–67].

In the present study, the functional impairment on admission was higher among those with VDD; however, after adjusting for confounders variables, the association was not significant, suggesting that these variables are more important to the early neurological deficit after the ischemic event than vitamin D status. However, we demonstrated an association between low levels of 25(OH)D and poor outcome after three-month follow-up, independently of age, sex, and the neurological deficit at admission of the patients. This result suggests that hypovitaminosis D could exacerbate stroke injury affecting post-stroke inflammatory responses, which play a critical role in the pathophysiology of cerebral ischemia [68].

The anti-inflammatory effect of vitamin D is exerted through the enhancement of anti-inflammatory Treg and Th2 development and cytokine production, whereas pro-inflammatory Th1 and Th17 subsets are suppressed [29,69,70], suggesting a possible mechanism by which VDD may exacerbate ischemic cell loss. Moreover, vitamin D induces neuroprotection by increasing neurotrophic factors, such as nerve growth factor (NGF), neurotrophins and glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) [71–76]. Therefore, VDD may also exacerbate ischemic cell loss by decreasing the availability of neuroprotective growth factors.

Our results are also consistent with those that showed an independent association between low levels of vitamin D and larger ischemic infarct volume [20,21,32],

which may partially explain the poor outcome and mortality in stroke patients with hypovitaminosis D [18,22,32–34,38]. Of note, Durup et al (2015) in an observational cohort study with approximately 250,000 subjects showed a reverse J-shape association between 25(OH)D and stroke mortality [9]. These authors showed a nonlinear association between these two variables, and both low and high 25(OH)D were associated with increased mortality from stroke. The lowest mortality rate for stroke was observed at approximately 30 ng/mL after adjusting for age, sex, and season.

These results should be taken into account regarding the importance to define the appropriate levels of vitamin D that may be sufficient to its major biological functions. In contrast, Ford et al (2014), showed with trial analysis of vitamin D supplementation in over 5,000 individuals, as well as with systematic review and meta-analysis of published clinical trials that evaluated vitamin D supplements, that vitamin D supplementation might protect against cardiac failure in older people but does not offer protection against myocardial infarction or stroke [77].

Some strengths and weaknesses deserve to be discussed. We have found a significant association between low vitamin D status with acute ischemic stroke, hsCRP, as well as with short-time outcome of patients, which remained significant after adjusted for confounder variables that could have influence the results. However, unavailable data on potential confounding factors, including serum parathyroid hormone, calcium concentrations, represent another limitation, and data on sun exposure, dietary intake of vitamin D and outdoor physical activity were not available.

5 CONCLUSION

Although the current study design do not allow to link the VDD with the causality of acute ischemic stroke, the independent association observed between vitamin D status with hsCRP, that is considered a valuable and sensitive indicator of initial and recurrent cerebrovascular events and underscore the important role of vitamin D in the ischemic stroke pathophysiology. In conclusion, hypovitaminosis D was associated with acute ischemic stroke and high levels of hsCRP, as well as with functional impairment at short-time outcome, suggesting the important role of vitamin D in the pathophysiology of this ischemic event. Further studies with large sample size of individuals are warranted to better understand the anti-inflammatory mechanisms of vitamin D and its involvement with acute ischemic stroke.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

All the authors declare that there is no conflict of interest.

REFERENCES

- [1] R.L. Sacco, S.E. Kasner, J.P. Broderick, L.R. Caplan, J.J.B. Connors, A. Culebras, et al., An updated definition of stroke for the 21st century: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association., *Stroke*. 44 (2013) 2064–89.
- [2] D. Mozaffarian, E.J. Benjamin, A.S. Go, D.K. Arnett, M.J. Blaha, M. Cushman, et al., Heart Disease and Stroke Statistics-2016 Update: A Report From the American Heart Association., *Circulation*. (2015)e36-e360.
- [3] M.A. Petty, J.G. Wettstein, Elements of cerebral microvascular ischaemia., *Brain Res. Brain Res. Rev.* 36 (2001) 23–34.
- [4] R. Ladeby, M. Wirenfeldt, D. Garcia-Ovejero, C. Fenger, L. Dissing-Olesen, I. Dalmau, et al., Microglial cell population dynamics in the injured adult central nervous system., *Brain Res. Brain Res. Rev.* 48 (2005) 196–206.
- [5] H.K. Kimelberg, Astrocytic swelling in cerebral ischemia as a possible cause of injury and target for therapy., *Glia*. 50 (2005) 389–97.
- [6] J. Kendrick, G. Targher, G. Smits, M. Chonchol, 25-Hydroxyvitamin D deficiency is independently associated with cardiovascular disease in the Third National Health and Nutrition Examination Survey., *Atherosclerosis*. 205 (2009) 255–60.
- [7] T.J. Wang, M.J. Pencina, S.L. Booth, P.F. Jacques, E. Ingelsson, K. Lanier, et al., Vitamin D deficiency and risk of cardiovascular disease., *Circulation*. 117 (2008) 503–11.
- [8] S. Pilz, A. Tomaschitz, E. Ritz, T.R. Pieber, Vitamin D status and arterial hypertension: a systematic review., *Nat. Rev. Cardiol.* 6 (2009) 621–30.
- [9] D. Durup, H.L. Jørgensen, J. Christensen, A. Tjønneland, A. Olsen, J. Halkjær, et al., A Reverse J-Shaped Association Between Serum 25-Hydroxyvitamin D and Cardiovascular Disease Mortality: The CopD Study., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 100 (2015) 2339–46.
- [10] O. Tarcin, D.G. Yavuz, B. Ozben, A. Telli, A.V. Ogunc, M. Yuksel, et al., Effect of Vitamin D Deficiency and Replacement on Endothelial Function in Asymptomatic Subjects, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 94 (2009) 4023–4030.
- [11] J. Mitri, M.D. Muraru, A.G. Pittas, Vitamin D and type 2 diabetes: a systematic review., *Eur. J. Clin. Nutr.* 65 (2011) 1005–15.
- [12] A. Zittermann, J. F. Gummert, J. Borgermann, The Role of Vitamin D in Dyslipidemia and Cardiovascular Disease, *Curr. Pharm. Des.* 17 (2011) 933–942.

- [13] D. Martins, M. Wolf, D. Pan, A. Zadshir, N. Tareen, R. Thadhani, et al., Prevalence of cardiovascular risk factors and the serum levels of 25-hydroxyvitamin D in the United States: data from the Third National Health and Nutrition Examination Survey., *Arch. Intern. Med.* 167 (2007) 1159–65.
- [14] M. Demir, U. Uyan, M. Melek, The effects of vitamin D deficiency on atrial fibrillation., *Clin. Appl. Thromb. Hemost.* 20 (2014) 98–103.
- [15] S. Pilz, H. Dobnig, J.E. Fischer, B. Wellnitz, U. Seelhorst, B.O. Boehm, et al., Low vitamin d levels predict stroke in patients referred to coronary angiography., *Stroke.* 39 (2008) 2611–3.
- [16] Q. Sun, a. Pan, F.B. Hu, J.E. Manson, K.M. Rexrode, 25-Hydroxyvitamin D Levels and the Risk of Stroke: A Prospective Study and Meta-analysis, *Stroke.* 43 (2012) 1470–1477.
- [17] J. Marniemi, E. Alanen, O. Impivaara, R. Seppänen, P. Hakala, T. Rajala, et al., Dietary and serum vitamins and minerals as predictors of myocardial infarction and stroke in elderly subjects., *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 15 (2005) 188–97.
- [18] P. Brøndum-Jacobsen, B.G. Nordestgaard, P. Schnohr, M. Benn, 25-hydroxyvitamin D and symptomatic ischemic stroke: an original study and meta-analysis., *Ann. Neurol.* 73 (2013) 38–47.
- [19] J.R. Chaudhuri, K.R. Mridula, S. Alladi, a Anamika, M. Umamahesh, B. Balaraju, et al., Serum 25-hydroxyvitamin d deficiency in ischemic stroke and subtypes in Indian patients., *J. Stroke.* 16 (2014) 44–50.
- [20] W.-J. Tu, S.-J. Zhao, D.-J. Xu, H. Chen, Serum 25-hydroxyvitamin D predicts the short-term outcomes of Chinese patients with acute ischaemic stroke., *Clin. Sci. (Lond).* 126 (2014) 339–46.
- [21] A. Turetsky, R.P. Goddeau, N. Henninger, Low Serum Vitamin D Is Independently Associated with Larger Lesion Volumes after Ischemic Stroke, *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* 24 (2015) 1555–1563.
- [22] K.-Y. Park, P.-W. Chung, Y.B. Kim, H.-S. Moon, B.-C. Suh, Y.S. Won, et al., Serum Vitamin D Status as a Predictor of Prognosis in Patients with Acute Ischemic Stroke, *Cerebrovasc. Dis.* 40 (2015) 73–80.
- [23] M. Holick, Vitamin D deficiency., *N. Engl. J. Med.* 357 (2007) 266–81.
- [24] P.R. Ebeling, Vitamin D and bone health: Epidemiologic studies., *Bonekey Rep.* 3 (2014) 511.

- [25] M. Cohen-Lahav, S. Shany, D. Tobvin, C. Chaimovitz, A. Douvdevani, Vitamin D decreases NFkappaB activity by increasing IkappaBalpha levels., *Nephrol. Dial. Transplant.* 21 (2006) 889–97.
- [26] Y.-N. Huang, Y.-J. Ho, C.-C. Lai, C.-T. Chiu, J.-Y. Wang, 1,25-Dihydroxyvitamin D3 attenuates endotoxin-induced production of inflammatory mediators by inhibiting MAPK activation in primary cortical neuron-glia cultures, *J. Neuroinflammation.* 12 (2015) 147.
- [27] X. Liu, A. Nelson, X. Wang, M. Farid, Y. Gunji, J. Ikari, et al., Vitamin D modulates prostaglandin E2 synthesis and degradation in human lung fibroblasts., *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 50 (2014) 40–50.
- [28] Y. Zhang, D.Y.M. Leung, B.N. Richers, Y. Liu, L.K. Remigio, D.W. Riches, et al., Vitamin D inhibits monocyte/macrophage proinflammatory cytokine production by targeting MAPK phosphatase-1., *J. Immunol.* 188 (2012) 2127–35.
- [29] A. Boonstra, F.J. Barrat, C. Crain, V.L. Heath, H.F. Savelkoul, A. O’Garra, 1alpha,25-Dihydroxyvitamin d3 has a direct effect on naive CD4(+) T cells to enhance the development of Th2 cells., *J. Immunol.* 167 (2001) 4974–80.
- [30] G. Penna, A. Roncari, S. Amuchastegui, K.C. Daniel, E. Berti, M. Colonna, et al., Expression of the inhibitory receptor ILT3 on dendritic cells is dispensable for induction of CD4+Foxp3+ regulatory T cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3., *Blood.* 106 (2005) 3490–7.
- [31] E.D. Michos, J.P. Reis, W.S. Post, P.L. Lutsey, R.F. Gottesman, T.H. Mosley, et al., 25-Hydroxyvitamin D deficiency is associated with fatal stroke among whites but not blacks: The NHANES-III linked mortality files., *Nutrition.* 28 (2012) 367–71.
- [32] Y. Wang, H. Ji, Y. Tong, Z. Zhang, Prognostic Value of Serum 25-Hydroxyvitamin D in Patients with Stroke, *Neurochem. Res.* 39 (2014) 1332–1337.
- [33] B. Daubail, A. Jacquin, J.-C. Guillard, M. Hervieu, G.-V. Osseby, O. Rouaud, et al., Serum 25-hydroxyvitamin D predicts severity and prognosis in stroke patients., *Eur. J. Neurol.* 20 (2013) 57–61.
- [34] B. Daubail, A. Jacquin, J.-C. Guillard, C. Khomri, C. Aboa-Eboulé, M. Giroud, et al., Association between serum concentration of vitamin D and 1-year mortality in stroke patients., *Cerebrovasc. Dis.* 37 (2014) 364–7.
- [35] M.J. Bolland, C.J. Bacon, A.M. Horne, B.H. Mason, R.W. Ames, T.K. Wang, et al., Vitamin D insufficiency and health outcomes over 5 y in older women., *Am. J. Clin. Nutr.* 91 (2010) 82–9.

- [36] C. Drechsler, S. Pilz, B. Obermayer-Pietsch, M. Verduijn, A. Tomaschitz, V. Krane, et al., Vitamin D deficiency is associated with sudden cardiac death, combined cardiovascular events, and mortality in haemodialysis patients., *Eur. Heart J.* 31 (2010) 2253–61.
- [37] A. Gupta, S. Prabhakar, M. Modi, S.K. Bhadada, V. Lal, D. Khurana, Vitamin D status and risk of ischemic stroke in North Indian patients., *Indian J. Endocrinol. Metab.* 18 (2014) 721–5.
- [38] T. Kühn, R. Kaaks, B. Teucher, F. Hirche, J. Dierkes, C. Weikert, et al., Plasma 25-Hydroxyvitamin D and Its Genetic Determinants in Relation to Incident Myocardial Infarction and Stroke in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Germany Study, *PLoS One.* 8 (2013) 1–12.
- [39] V. Majumdar, P. Prabhakar, G.B. Kulkarni, R. Christopher, Vitamin D status, hypertension and ischemic stroke: a clinical perspective., *J. Hum. Hypertens.* (2015).
- [40] H.P. Adams, B.H. Bendixen, L.J. Kappelle, J. Biller, B.B. Love, D.L. Gordon, et al., Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment., *Stroke.* 24 (1993) 35–41.
- [41] Brazil, Characteristics of the Population and Households: Results of the Universe., *Charact. Popul. Households Results Universe.* (2011). http://www.ibge.gov.br/english/estatistica/populacao/censo2010/caracteristicas_da_populacao/default_caracteristicas_da_populacao.shtm. (accessed February 8, 2015).
- [42] P.A. James, S. Oparil, B.L. Carter, W.C.ushman, C. Dennison-Himmelfarb, J. Handler, et al., 2014 evidence-based guideline for the management of high blood pressure in adults: report from the panel members appointed to the Eighth Joint National Committee (JNC 8)., *JAMA.* 311 (2014) 507–20.
- [43] American Diabetes Association, Standards of medical care in diabetes--2014., *Diabetes Care.* 37 Suppl 1 (2014) S14–80.
- [44] Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report., *Circulation.* 105 (2002) 3143-421.
- [45] R. Bonita, R. Beaglehole, Recovery of motor function after stroke., *Stroke.* 19 (1988) 1497–500.
- [46] M.S. Oh, K.-H. Yu, M.-K. Chu, H.-I. Ma, Y.J. Kim, J.Y. Kim, et al., Long-term prognosis of symptomatic isolated middle cerebral artery disease in Korean stroke patients., *BMC Neurol.* 11 (2011) 138.

- [47] Y.C. Li, Vitamin D regulation of the renin-angiotensin system., *J. Cell. Biochem.* 88 (2003) 327–31.
- [48] S.U. Nigwekar, R. Thadhani, Vitamin D receptor activation: cardiovascular and renal implications., *Kidney Int. Suppl.* 3 (2013) 427–430.
- [49] H.A. Malek, A. Shata, Effect of a high dose of vitamin D on a rabbit model of atherosclerosis., *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 27 (2014) 195–201.
- [50] G. Jones, Pharmacokinetics of vitamin D toxicity., *Am. J. Clin. Nutr.* 88 (2008) 582S–586S.
- [51] B. Rostkowska-Nadolska, E. Sliupkas-Dyrda, J. Potyka, D. Kusmierz, M. Fraczek, T. Krecicki, et al., Vitamin D derivatives: calcitriol and tacalcitol inhibits interleukin-6 and interleukin-8 expression in human nasal polyp fibroblast cultures., *Adv. Med. Sci.* 55 (2010) 86–92.
- [52] A.K. Shrivastava, H.V. Singh, A. Raizada, S.K. Singh, C-reactive protein, inflammation and coronary heart disease, *Egypt. Hear. J.* 67 (2014) 89–97.
- [53] C.J. Smith, H.C.A. Emsley, C.M. Gavin, R.F. Georgiou, A. Vail, E.M. Barberan, et al., Peak plasma interleukin-6 and other peripheral markers of inflammation in the first week of ischaemic stroke correlate with brain infarct volume, stroke severity and long-term outcome., *BMC Neurol.* 4 (2004) 2.
- [54] P. Welsh, G.D.O. Lowe, J. Chalmers, D.J. Campbell, A. Rumley, B.C. Neal, et al., Associations of Proinflammatory Cytokines With the Risk of Recurrent Stroke, *Stroke.* 39 (2008) 2226–2230.
- [55] J.F. Arenillas, J. Alvarez-Sabín, C.A. Molina, P. Chacón, J. Montaner, A. Rovira, et al., C-reactive protein predicts further ischemic events in first-ever transient ischemic attack or stroke patients with intracranial large-artery occlusive disease., *Stroke.* 34 (2003) 2463–8.
- [56] M. Di Napoli, F. Papa, V. Bocola, Prognostic influence of increased C-reactive protein and fibrinogen levels in ischemic stroke., *Stroke.* 32 (2001) 133–8.
- [57] P. Cirillo, P. Golino, P. Calabro, G. Cali, M. Ragni, S. DEROSA, et al., C-reactive protein induces tissue factor expression and promotes smooth muscle and endothelial cell proliferation, *Cardiovasc. Res.* 68 (2005) 47–55.
- [58] V. Pasceri, J.S. Cheng, J.T. Willerson, E.T. Yeh, J. Chang, Modulation of C-reactive protein-mediated monocyte chemoattractant protein-1 induction in human endothelial cells by anti-atherosclerosis drugs., *Circulation.* 103 (2001) 2531–4.
- [59] V. Pasceri, J.T. Willerson, E.T.H. Yeh, Direct Proinflammatory Effect of C-Reactive Protein on Human Endothelial Cells, *Circulation.* 102 (2000) 2165–2168.

- [60] S.K. Venugopal, S. Devaraj, I. Yuhanna, P. Shaul, I. Jialal, Demonstration that C-reactive protein decreases eNOS expression and bioactivity in human aortic endothelial cells., *Circulation*. 106 (2002) 1439–41.
- [61] C. Chen, B. Nan, P. Lin, Q. Yao, C-reactive protein increases plasminogen activator inhibitor-1 expression in human endothelial cells., *Thromb. Res.* 122 (2008) 125–33.
- [62] Y. Hattori, Matsumura, K. Kasai, Vascular smooth muscle cell activation by C-reactive protein, *Cardiovasc. Res.* 58 (2003) 186–195.
- [63] N.S. Rost, P.A. Wolf, C.S. Kase, M. Kelly-Hayes, H. Silbershatz, J.M. Massaro, et al., Plasma concentration of C-reactive protein and risk of ischemic stroke and transient ischemic attack: the Framingham study., *Stroke*. 32 (2001) 2575–9.
- [64] K.W. Muir, C.J. Weir, W. Alwan, I.B. Squire, K.R. Lees, C-reactive protein and outcome after ischemic stroke., *Stroke*. 30 (1999) 981–5.
- [65] K. Winbeck, H. Poppert, T. Etgen, B. Conrad, D. Sander, Prognostic relevance of early serial C-reactive protein measurements after first ischemic stroke., *Stroke*. 33 (2002) 2459–64.
- [66] L. Marquardt, A. Ruf, U. Mansmann, R. Winter, F. Buggle, K. Kallenberg, et al., Inflammatory response after acute ischemic stroke., *J. Neurol. Sci.* 236 (2005) 65–71.
- [67] J. Montaner, I. Fernandez-Cadenas, C. a. Molina, M. Ribó, R. Huertas, A. Rosell, et al., Poststroke C-reactive protein is a powerful prognostic tool among candidates for thrombolysis, *Stroke*. 37 (2006) 1205–1210.
- [68] N. Vila, J. Castillo, A. Dávalos, A. Chamorro, Proinflammatory cytokines and early neurological worsening in ischemic stroke., *Stroke*. 31 (2000) 2325–9.
- [69] J. Tang, R. Zhou, D. Luger, W. Zhu, P.B. Silver, R.S. Grajewski, et al., Calcitriol Suppresses Antiretinal Autoimmunity through Inhibitory Effects on the Th17 Effector Response, *J. Immunol.* 182 (2009) 4624–4632.
- [70] M.T. Cantorna, L. Snyder, Y.-D. Lin, L. Yang, Vitamin D and 1,25(OH)₂D regulation of T cells., *Nutrients*. 7 (2015) 3011–21.
- [71] I. Neveu, P. Naveilhan, F. Jehan, C. Baudet, D. Wion, H.F. De Luca, et al., 1,25-dihydroxyvitamin D₃ regulates the synthesis of nerve growth factor in primary cultures of glial cells., *Brain Res. Mol. Brain Res.* 24 (1994) 70–6.
- [72] R. Balden, A. Selvamani, F. Sohrabji, Vitamin D deficiency exacerbates experimental stroke injury and dysregulates ischemia-induced inflammation in adult rats, *Endocrinology*. 153 (2012) 2420–2435.

- [73] D. Baas, K. Prüfer, M.E. Ittel, S. Kuchler-Bopp, G. Labourdette, L.L. Sarliève, et al., Rat oligodendrocytes express the vitamin D(3) receptor and respond to 1,25-dihydroxyvitamin D(3)., *Glia*. 31 (2000) 59–68.
- [74] I. Neveu, P. Naveilhan, C. Baudet, P. Brachet, M. Metsis, 1,25-dihydroxyvitamin D3 regulates NT-3, NT-4 but not BDNF mRNA in astrocytes., *Neuroreport*. 6 (1994) 124–6.
- [75] Y. Wang, Y.H. Chiang, T.P. Su, T. Hayashi, M. Morales, B.J. Hoffer, et al., Vitamin D(3) attenuates cortical infarction induced by middle cerebral arterial ligation in rats., *Neuropharmacology*. 39 (2000) 873–80.
- [76] E. Garcion, N. Wion-Barbot, C.N. Montero-Menei, F. Berger, D. Wion, New clues about vitamin D functions in the nervous system., *Trends Endocrinol. Metab.* 13 (2002) 100–5.
- [77] J.A. Ford, G.S. MacLennan, A. Avenell, M. Bolland, A. Grey, M. Witham, Cardiovascular disease and vitamin D supplementation: trial analysis, systematic review, and meta-analysis., *Am. J. Clin. Nutr.* 100 (2014) 746–55.

Table 1 Baseline characteristics and vitamin D status of acute ischemic stroke patients and controls

| Characteristics | Controls (n=118) | Stroke Patients (n=168) | p-value |
|--|-----------------------|----------------------------|---------|
| Age (years) | 65.16 (\pm 1.12) | 67.87 (\pm 1.03) | 0.080 |
| Sex | | | |
| Male | 57 (48.30) | 96 (57.14) | 0.140 |
| Female | 61 (51.69) | 72 (42.86) | |
| Ethnicity | | | |
| Caucasian | 97 (82.20) | 132 (78.57) | 0.449 |
| Non Caucasian | 21 (17.80) | 36 (21.43) | |
| BMI (kg/m ²) [†] | 27.26 (\pm 0.41) | 26.42 (\pm 0.49) | 0.085 |
| Hypertension | 59 (50.0) | 145 (83.30) | <0.0001 |
| Diabetes Mellitus | 30 (25.42) | 64 (38.10) | 0.025 |
| Dyslipidemia | 41 (34.74) | 74 (44.04) | 0.221 |
| Smoking | 8 (6.78) | 39 (23.21) | <0.0001 |
| Antihypertensive | 51 (43.22) | 119 (70.83) | <0.0001 |
| Hypoglycemic | 20 (16.95) | 42 (25.0) | 0.065 |
| Hypolipemiant | 25 (21.19) | 45 (26.79) | 0.188 |
| Vitamin D (ng/mL) | 30.37 (\pm 0.80) | 22.54 (\pm 0.82) | <0.0001 |
| Vitamin D status | | | |
| Deficient (<20.0 ng/mL) | 6 (5.08) | 73 (43.45) | <0.001 |
| Insufficient (<30.0 ng/mL \geq 20 ng/mL) | 59 (50.0) | 57 (33.93) | |
| Sufficient (\geq 30 ng/mL) | 53 (44.92) | 38 (22.62) | |
| Platelets (x10 ³ cells/mm ³) [†] | 226.14 (\pm 5.95) | 225.8 (\pm 7.394) | 0.303 |
| Leukocyte (cells/mm ³) | 6700 (\pm 221) | 9529 (\pm 250) | <0.0001 |
| ESR (mm/h) [†] | 11.80 (1.00) | 20.05 (\pm 1.70) | 0.002 |
| hsCRP (mg/L) [†] | 2.77 (\pm 0.26) | 19.93 (\pm 2.29) | <0.0001 |
| Ferritin (ng/mL) [†] | 153.98 (\pm 12.38) | 273.74 (\pm 27.35) | 0.002 |
| TNF- α (pg/mL) [†] | 4.61 (\pm 1.02) | 6.50 (\pm 1.06) | 0.014 |
| IL-6 (pg/mL) [†] | 13.25 (\pm 39.89) | 21.05 (\pm 2.53) | <0.0001 |
| IL-10 (pg/mL) [†] | 7.54 (\pm 0.51) | 11.85 (\pm 2.63) | 0.088 |

The continuous variables were expressed as mean \pm standard error of mean (SEM); the categorical variables were expressed as number (n) and percentage (%).

[†] These variables are processed in Ln transformation.

BMI: body mass index; SBP: Systolic Blood Pressure; DBP: Diastolic Blood Pressure; ESR: Erythrocyte Sedimentation Rate; hsCRP: high sensitive C reactive protein; TNF- α : tumor necrosis factor alpha; IL: interleukin.

Table 2 Odds ratio (95% confidence interval) of acute ischemic stroke for vitamin D status at baseline

| Vitamin D status | Model 1 | Model 2 | Model 3 | Model 4 | Model 5 | Model 6 |
|---|---------------------------------------|---------------------------------------|---|---|---------------------------------------|--|
| Deficient (<20.0 ng/mL) | 16.32 (5.89-45.17) $p < 0.0001$ | 16.07 (5.77-44.70) $p < 0.0001$ | 18.12 (6.12-53.63) p $p < 0.0001$ | 17.69 (5.93-52.75) p $p < 0.0001$ | 17.78 (5.96-53.01) $p < 0.0001$ | 18.40 (6.14-55.175) $p < 0.0001$ |
| Insufficient (<30.0 - ≥ 20 ng/mL) | 1.615 (0.87-2.98) $p = 0.127$ | 1.44 (0.77-2.72) $p = 0.250$ | 1.42 (0.72-2.81) $p = 0.307$ | 1.41 (0.71-2.79) $p = 0.319$ | 1.42 (0.72-2.81) $p = 0.311$ | 1.36 (0.67-2.74) $p = 0.39$ |
| Sufficient (≥ 30 ng/mL) | 1 (Reference) | 1 (Reference) | 1 (Reference) | 1 (Reference) | 1 (Reference) | 1 (Reference) |

CI: confidence interval;

Model 1, adjusted for age (years), gender, body mass index levels (kg/m^2), and ethnicity;

Model 2, additionally adjusted for smoking status (yes/no);

Model 3, additionally adjusted for hypertension (yes/no);

Model 4, additionally adjusted for diabetes (yes/no);

Model 5, additionally adjusted for dyslipidemia (yes/no);

Model 6 additionally adjusted for antihypertension, hypoglycemic, and hypolipemiant drugs.

Table 3 Demographic, epidemiological, and clinical characteristics of acute ischemic stroke patients, according to their vitamin D status

| Variables | Ischemic Stroke Patients | | | p-value |
|--|----------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|---------|
| | Vitamin D | Vitamin D | Vitamin D | |
| | Deficient ^A (n=73) | Insufficient ^B (n=57) | Sufficient ^C (n=38) | |
| Vitamin D (ng/mL) [†] | 13.85 (±0.51) ^{B,C} | 23.83 (±0.36) ^{A,C} | 37.30 (±1.48) ^{A,B} | <0.0001 |
| Age (years) | 71.27 (±1.50) ^{B,C} | 66.47 (±1.60) ^A | 63.34 (±2.40) ^A | 0.008 |
| Sex | | | | |
| Male | 32 (33.33) | 35 (36.46) | 29 (30.21) | 0.003 |
| Female | 41 (56.94) ^{B,C} | 22 (30.56) ^A | 9 (12.50) ^A | |
| Ethnicity | | | | |
| Caucasian | 58 (43.94) | 44 (33.33) | 30 (22.73) | 0.951 |
| Non Caucasian | 15 (41.67) | 13 (36.11) | 8 (22.22) | |
| BMI (kg/m ²) | 26.76 (±0.94) | 26.32 (±0.76) | 26.07 (±0.79) | 0.850 |
| Hypertension | 64 (87.67) | 50 (87.72) | 31 (81.58) | 0.628 |
| Diabetes mellitus | 32 (43.83) | 21 (36.84) | 11 (28.95) | 0.300 |
| Dyslipidemia | 33 (45.20) | 30 (52.63) | 11 (28.95) | 0.090 |
| Smoking | 14 (19.18) | 15 (26.31) | 8 (21.05) | 0.745 |
| Stroke subtypes | | | | |
| LAAS | 21 (28.78) | 25 (43.87) | 12 (31.58) | 0.861 |
| LAC | 26 (35.61) | 15 (26.31) | 12 (31.58) | |
| CEI | 14 (19.18) | 7 (12.28) | 5 (13.15) | |
| ODE | 2 (2.74) | 2 (3.51) | 1 (2.63) | |
| UDE | 10 (13.69) | 8 (14.03) | 8 (21.06) | |
| mRs at baseline ^a | 4.03(±0.2) ^{B,C} | 3.50 (±0.2) ^A | 3.52 (±0.2) ^A | 0.047 |
| mRS after three-month follow-up ^b | 4.22 (±0.3) | 3.47 (±0.3) | 3.18 (0.3) | 0.068 |

The continuous variables were expressed as mean ± standard error of mean (SEM); the categorical variables were expressed as number (n) and percentage (%).

[†] These variables are processed in Ln transformation.

^A Vitamin D deficient: 25(OH)D <20 ng/mL; ^B Vitamin D insufficient: 25(OH)D ≥20 ng/mL <30ng/mL; ^C Vitamin D sufficient: 25(OH)D ≥30ng/mL; ^a Analyzed 157 patients; ^b Analyzed 134 patients.

LAAS: Large Artery Atherosclerosis Stroke; LAC: Lacunar infarct; CEI: Cardio-Embolic Infarct; ODE: Other determined etiology; UDE: Undetermined etiology; mRS: modified Rankin Scale.

Table 4 Inflammatory markers of acute ischemic stroke patients, according to their vitamin D status

| Variables | Ischemic Stroke Patients | | | p-value |
|---|----------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|---------|
| | Vitamin D Deficient ^A | Vitamin D Insufficient ^B | Vitamin D Sufficient ^C | |
| | (n=73) | (n=57) | (n=38) | |
| Platelets (x10 ³ cells/mm ³) | 224.42 (±9.67) | 236.11 (±16.8) | 225.83 (±9.04) | 0.510 |
| Leukocyte (cells/mm ³) | 9464 (±423) | 9547 (±371) | 9629 (±517) | 0.967 |
| ESR (mm/h) [†] | 23.47 (±2.90) ^C | 19.77 (±2.70) | 14.16 (±2.50) ^A | 0.016 |
| hsCRP (mg/L) [†] | 30.09 (±4.57) ^{B,C} | 14.40 (±2.39) ^A | 8.55 (±2.02) ^A | 0.002 |
| Ferritin (ng/mL) [†] | 286.30 (±41.54) | 252.44 (±44.18) | 281.64 (±64.33) | 0.877 |
| TNF-α (pg/mL) [†] | 4.13 (±0.52) | 9.83 (±1.83) | 6.55 (±2.67) | 0.101 |
| IL-6 (pg/mL) [†] | 28.92 (±4.93) ^{B,C} | 16.07 (±3.28) ^A | 11.46 (±2.42) ^A | 0.001 |
| IL-10 (pg/mL) [†] | 13.72 (±5.22) | 9.10 (±1.83) | 12.35 (5.19) | 0.357 |

The continuous variables were expressed as mean ± standard error of mean (SEM);); the categorical variables were expressed as number (n) and percentage (%).

[†] These variables are processed in Ln transformation.

^A Vitamin D deficient: 25(OH)D <20 ng/mL; ^B Vitamin D insufficient: 25(OH)D ≥20 ng/mL <30ng/mL; ^C Vitamin D insufficient: 25(OH)D ≥30ng/mL

ESR: Erythrocyte Sedimentation Rate; hsCRP: high sensitive C reactive protein; TNF-α: tumor necrosis factor alpha; IL: interleukin.

Table 5 Results of multinomial logistic regression analysis between explanatory variables and vitamin D status of acute ischemic stroke patients

| Variables | χ^2 | p | Wald for contrasts | p-value | OR | CI 95% |
|---------------------------------|----------|-------|--------------------|---------|-------|--------------|
| Age (Years) | 2.877 | 0.237 | A vs B: 2.186 | 0.139 | 0.971 | 0.934-1.010 |
| | | | A vs C: 1.905 | 0.168 | 1.032 | 0.987-1.079 |
| | | | B vs C: 0.071 | 0.933 | 1.002 | 0.960-1.045 |
| Sex (female) | 5.850 | 0.054 | A vs B: 2.154 | 0.142 | 0.483 | 0.183-1.276 |
| | | | A vs C: 5.169 | 0.023 | 3.989 | 1.210-13.146 |
| | | | B vs C: 1.163 | 0.281 | 1.927 | 0.585-6.347 |
| Dyslipidemia | 4.597 | 0.096 | A vs B: 0.001 | 0.992 | 0.995 | 0.380-2.609 |
| | | | A vs C: 3.430 | 0.064 | 3.114 | 0.937-10.347 |
| | | | B vs C: 3.729 | 0.053 | 3.098 | 0.983-9.765 |
| hsCRP (mg/L) | 6.753 | 0.034 | A vs B: 2.895 | 0.089 | 0.980 | 0.957-1.003 |
| | | | A vs C: 4.076 | 0.043 | 1.038 | 1.001-1.077 |
| | | | B vs C: 0.762 | 0.383 | 1.017 | 0.979-1.057 |
| IL-6 (pg/mL) | 1.010 | 0.606 | A vs B: 0.453 | 0.501 | 0.994 | 0.978-1.011 |
| | | | A vs C: 0.651 | 0.420 | 1.009 | 0.987-1.033 |
| | | | B vs C: 0.087 | 0.769 | 1.004 | 0.979-1.029 |
| ESR (mm/h) | 1.156 | 0.561 | A vs B: 0.663 | 0.416 | 0.991 | 0.969-1.013 |
| | | | A vs C: 0.811 | 0.368 | 1.014 | 0.983-1.047 |
| | | | B vs C: 0.90 | 0.764 | 1.005 | 0.973-1.038 |
| mRs at baseline | 0.506 | 0.777 | A vs B: 0.058 | 0.809 | 0.944 | 0.591-1.507 |
| | | | A vs C: 0.193 | 0.666 | 0.885 | 0.512-1.529 |
| | | | B vs C: 0.497 | 0.481 | 0.835 | 0.506-1.378 |
| mRS after three-month follow-up | 1.064 | 0.578 | A vs B: 0.135 | 0.519 | 0.917 | 0.704-1.194 |
| | | | A vs C: 1.026 | 0.311 | 1.167 | 0.866-1.572 |
| | | | B vs C: 0.217 | 0.641 | 1.070 | 0.806-1.402 |

^A Vitamin D deficient: 25(OH)D <20 ng/mL; ^B Vitamin D insufficient: 25(OH)D ≥20 ng/mL <30ng/mL; ^C Vitamin D insufficient: 25(OH)D ≥30ng/mL.

OR: odds ratio; CI: confidence interval; ESR: Erythrocyte Sedimentation Rate; hsCRP: high sensitive C reactive protein; TNF- α : tumor necrosis factor alpha; IL: interleukin; mRS: modified Rankin Scale.

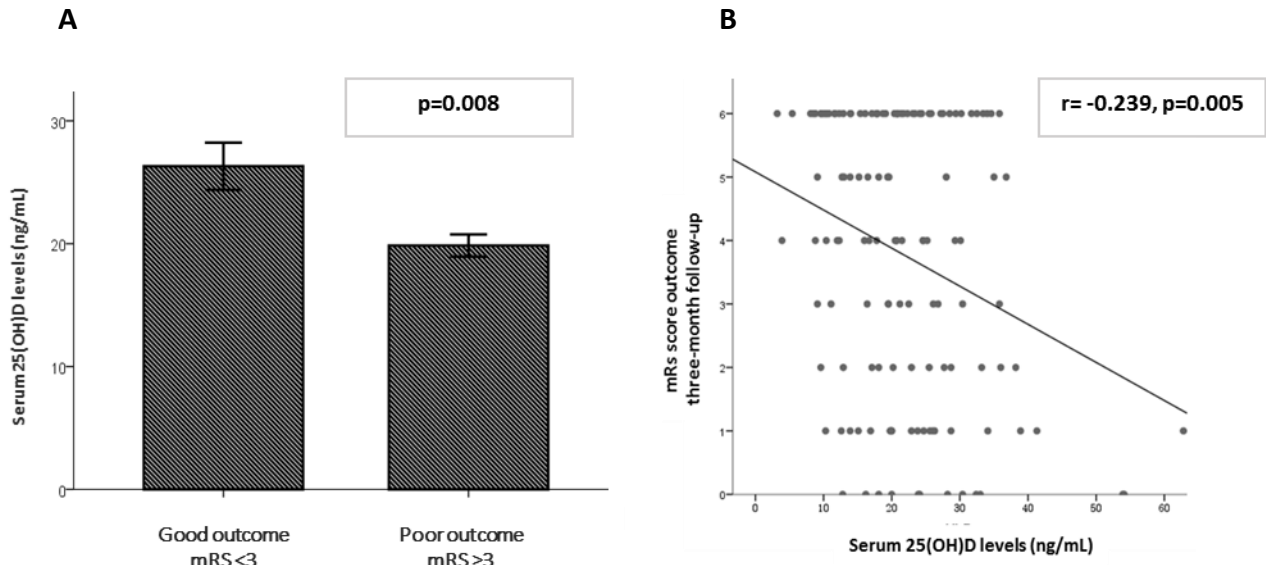


Figure 1 Serum 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D] levels according to the short-time outcome of patients with acute ischemic stroke. **A:** Association between serum 25(OH)D levels and short-time outcome evaluated using modified Rankin Scale (mRS) three-month follow-up. Good outcome (mRS <3) and Poor outcome (mRS ≥3); the analyze was adjusted for age, sex and mRS baseline, p=0.008. **B:** Spearman rank correlation between serum 25(OH)D levels and functional impairment (mRS) after three-month follow-up (r= -0.239, p=0.005).

6. CONCLUSÃO

O presente estudo permite as seguintes conclusões:

- Os pacientes com AVEi apresentaram maior frequência dos fatores de riscos modificáveis para o AVEi agudo como, hipertensão, DM e tabagismo; além disso, pacientes apresentaram níveis mais elevados de marcadores inflamatórios, tais como VHS, contagem total de leucócitos periféricos, usPCR, IL-6, TNF- α e ferritina quando comparados aos controles;
- Os pacientes com AVEi apresentaram menores níveis de 25(OH)D quando comparados aos controles;
- A VDD foi mais frequente entre os pacientes com AVEi comparada aos controles; pacientes com VDD demonstraram 18,40 vezes mais chances para AVEi quando comparados com VDS, independente de idade, sexo, etnia, IMC, tabagismo, presença de diabetes, hipertensão arterial, dislipidemia e medicamentos usados no período pré-AVEi;
- Pacientes com status de VDD foram independentemente associados com sexo feminino e níveis elevados de usPCR do que aqueles com VDS;
- Baixos níveis de 25(OH)D associados com pior prognóstico dos pacientes após três meses do evento isquêmico; além disso, os níveis de 25(OH)D apresentaram correlação negativa com os escores do déficit funcional após três meses do evento isquêmico.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados confirmam a extensa resposta inflamatória nos pacientes com AVEi agudo e sugerem a vitamina D como uma das moléculas imunoreguladoras deste processo inflamatório. A associação entre VDD com o evento isquêmico e níveis elevados de usPCR, assim como a associação entre baixos níveis de 25(OH)D com a incapacidade funcional do paciente após seguimento de curto prazo, sugerem que a vitamina D desempenha um importante papel na fisiopatologia do AVEi agudo. No entanto, novos estudos com número maior de indivíduos são necessários para melhor compreensão dos mecanismos anti-inflamatórios da vitamina D e avaliar sua utilidade como fator preditor da ocorrência e prognóstico do evento isquêmico.

8. REFERÊNCIAS

ABRAMCZUK, B.; VILLELA, E. A luta contra o AVC no Brasil. **ComCiência**, n. 109, 2009.

ABUBAKAR, S. et al. **Relationship between admission serum C-reactive protein and short term outcome following acute ischaemic stroke at a tertiary health institution in Nigeria** *Nigerian Journal of Clinical Practice* Medical and Dental Consultants' Association of Nigeria (MDCAN), , 2013.

ADAMS, H. P. et al. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. **Stroke; a journal of cerebral circulation**, v. 24, n. 1, p. 35–41, Jan. 1993.

ADAMS, H. P. et al. Guidelines for the Early Management of Adults With Ischemic Stroke: A Guideline From the American Heart Association/American Stroke Association Stroke Council, Clinical Cardiology Council, Cardiovascular Radiology and Intervention Council, and the Atheros. **Circulation**, v. 115, n. 20, p. e478–e534, 2007.

AIHARA, K. et al. Disruption of nuclear vitamin D receptor gene causes enhanced thrombogenicity in mice. **The Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 34, p. 35798–802, 20 Aug. 2004.

ALMIRALL, J. et al. Association of low serum 25-hydroxyvitamin D levels and high arterial blood pressure in the elderly. **Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association**, v. 25, n. 2, p. 503–9, Feb. 2010.

ALROY, I.; TOWERS, T. L.; FREEDMAN, L. P. Transcriptional repression of the interleukin-2 gene by vitamin D3: direct inhibition of NFATp/AP-1 complex formation by a nuclear hormone receptor. **Molecular and cellular biology**, v. 15, n. 10, p. 5789–99, Oct. 1995.

AMANTEA, D. et al. Post-ischemic brain damage: pathophysiology and role of inflammatory mediators. **The FEBS journal**, v. 276, n. 1, p. 13–26, Jan. 2009.

AMER, M.; QAYYUM, R. Relation between serum 25-hydroxyvitamin D and C-reactive protein in asymptomatic adults (from the continuous National Health and Nutrition Examination Survey 2001 to 2006). **The American journal of cardiology**, v. 109, n. 2, p. 226–30, 15 Jan. 2012.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of medical care in diabetes--2014. **Diabetes care**, v. 37 Suppl 1, n. Supplement_1, p. S14–80, 1 Jan. 2014.

ARENILLAS, J. F. et al. C-reactive protein predicts further ischemic events in first-ever transient ischemic attack or stroke patients with intracranial large-artery occlusive disease. **Stroke; a journal of cerebral circulation**, v. 34, n. 10, p. 2463–8, Oct. 2003.

ARMAS, L. A. G.; HOLLIS, B. W.; HEANEY, R. P. Vitamin D2 is much less effective than vitamin D3 in humans. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 89, n. 11, p. 5387–

91, Nov. 2004.

BAAS, D. et al. Rat oligodendrocytes express the vitamin D(3) receptor and respond to 1,25-dihydroxyvitamin D(3). **Glia**, v. 31, n. 1, p. 59–68, Jul. 2000.

BAEUERLE, P. A.; HENKEL, T. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. **Annual review of immunology**, v. 12, p. 141–79, Jan. 1994.

BALABANOVA, S. et al. 25-Hydroxyvitamin D, 24, 25-dihydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D in human cerebrospinal fluid. **Klinische Wochenschrift**, v. 62, n. 22, p. 1086–90, 15 Nov. 1984.

BANERJEE, C. et al. Duration of diabetes and risk of ischemic stroke: The Northern Manhattan Study. **Stroke**, v. 43, p. 1212–1217, 2012.

BARONE, F. C.; FEUERSTEIN, G. Z. Inflammatory mediators and stroke: new opportunities for novel therapeutics. **Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 19, n. 8, p. 819–34, Aug. 1999.

BEZZI, P. et al. CXCR4-activated astrocyte glutamate release via TNFalpha: amplification by microglia triggers neurotoxicity. **Nature neuroscience**, v. 4, n. 7, p. 702–10, Jul. 2001.

BHAN, I. Vitamin D Binding Protein and Bone Health. **International Journal of Endocrinology**, v. 2014, p. 1–5, Jan. 2014.

BIELEWICZ, J. et al. Can CRP affect the blood-brain barrier during acute ischemic stroke ? **Pol J Public Health**, v. 125, n. 2, p. 99–102, 2015.

BIKLE, D. Nonclassic actions of vitamin D. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 94, n. 1, p. 26–34, Jan. 2009.

BJORKMAN, M. P.; SORVA, A. J.; TILVIS, R. S. C-reactive protein and fibrinogen of bedridden older patients in a six-month vitamin D supplementation trial. **The journal of nutrition, health & aging**, v. 13, n. 5, p. 435–9, May 2009.

BOLLAND, M. J. et al. Vitamin D insufficiency and health outcomes over 5 y in older women. **The American journal of clinical nutrition**, v. 91, n. 1, p. 82–9, Jan. 2010.

BONITA, R.; BEAGLEHOLE, R. Recovery of motor function after stroke. **Stroke; a journal of cerebral circulation**, v. 19, n. 12, p. 1497–500, Dec. 1988.

BOONSTRA, A. et al. 1alpha,25-Dihydroxyvitamin d3 has a direct effect on naive CD4(+) T cells to enhance the development of Th2 cells. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 167, n. 9, p. 4974–80, 1 Nov. 2001.

BORSELLO, T. et al. A peptide inhibitor of c-Jun N-terminal kinase protects against excitotoxicity and cerebral ischemia. **Nature medicine**, v. 9, n. 9, p. 1180–6, Sep. 2003.

BOZIC, M. et al. Impaired Vitamin D Signaling in Endothelial Cell Leads to an Enhanced

Leukocyte-Endothelium Interplay: Implications for Atherosclerosis Development. **PloS one**, v. 10, n. 8, p. e0136863, Jan. 2015.

BRASIL. **Sistema de Informações de Mortalidade (SIM) e IBGE**. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2011/c08.def>>. Acesso em: 6 jan. 2016.

BREWER, L. D. et al. Vitamin D hormone confers neuroprotection in parallel with downregulation of L-type calcium channel expression in hippocampal neurons. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 21, n. 1, p. 98–108, 1 Jan. 2001.

BRØNDUM-JACOBSEN, P. et al. 25-hydroxyvitamin D and symptomatic ischemic stroke: an original study and meta-analysis. **Annals of neurology**, v. 73, n. 1, p. 38–47, Jan. 2013.

BRUCE, A. J. et al. Altered neuronal and microglial responses to excitotoxic and ischemic brain injury in mice lacking TNF receptors. **Nature medicine**, v. 2, n. 7, p. 788–94, Jul. 1996.

BURGESS, E. D.; HAWKINS, R. G.; WATANABE, M. Interaction of 1,25-dihydroxyvitamin D and plasma renin activity in high renin essential hypertension. **American journal of hypertension**, v. 3, n. 12 Pt 1, p. 903–5, Dec. 1990.

CANDELARIO-JALIL, E. Injury and repair mechanisms in ischemic stroke: considerations for the development of novel neurotherapeutics. **Current opinion in investigational drugs (London, England : 2000)**, v. 10, n. 7, p. 644–54, Jul. 2009.

CAPRIO, M.; MAMMI, C.; ROSANO, G. M. C. Vitamin D: a novel player in endothelial function and dysfunction. **Archives of medical science : AMS**, v. 8, n. 1, p. 4–5, 29 Feb. 2012.

CARBONE, F.; MACH, F.; MONTECUCCO, F. Update on the role of neutrophils in atherosclerotic plaque vulnerability. **Current drug targets**, v. 16, n. 4, p. 321–33, Jan. 2015.

CASTILLO, J. et al. Molecular signatures of brain injury after intracerebral hemorrhage. **Neurology**, v. 58, n. 4, p. 624–629, 26 Feb. 2002.

CEULEMANS, A.-G. et al. The dual role of the neuroinflammatory response after ischemic stroke: modulatory effects of hypothermia. **Journal of Neuroinflammation**, v. 7, n. 1, p. 74, 2010.

CHAUDHURI, J. R. et al. Serum 25-hydroxyvitamin d deficiency in ischemic stroke and subtypes in Indian patients. **Journal of stroke**, v. 16, n. 1, p. 44–50, 2014.

CHEN, S. et al. Modulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on human B cell differentiation. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 179, n. 3, p. 1634–47, 1 Aug. 2007.

CHEN, S. et al. Cardiomyocyte-specific deletion of the vitamin D receptor gene results in cardiac hypertrophy. **Circulation**, v. 124, n. 17, p. 1838–47, 25 Oct. 2011.

CHRISTOV, A.; OTTMAN, J. T.; GRAMMAS, P. Vascular inflammatory, oxidative and protease-based processes: implications for neuronal cell death in Alzheimer's disease. **Neurological**

research, v. 26, n. 5, p. 540–6, Jul. 2004.

CHU, L. et al. Pranlukast reduces neutrophil but not macrophage/microglial accumulation in brain after focal cerebral ischemia in mice. **Acta pharmacologica Sinica**, v. 27, n. 3, p. 282–8, Mar. 2006.

CIPPITELLI, M.; SANTONI, A. Vitamin D3: a transcriptional modulator of the interferon-gamma gene. **European journal of immunology**, v. 28, n. 10, p. 3017–30, Oct. 1998.

COHEN-LAHAV, M. et al. Vitamin D decreases NFkappaB activity by increasing IkappaBalpha levels. **Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association**, v. 21, n. 4, p. 889–97, Apr. 2006.

COULTHARD, L. R. et al. p38(MAPK): stress responses from molecular mechanisms to therapeutics. **Trends in molecular medicine**, v. 15, n. 8, p. 369–79, Aug. 2009.

DANESH, J. et al. Association of fibrinogen, C-reactive protein, albumin, or leukocyte count with coronary heart disease: meta-analyses of prospective studies. **JAMA**, v. 279, n. 18, p. 1477–82, 13 May 1998.

DANIEL, C. et al. Immune Modulatory Treatment of Trinitrobenzene Sulfonic Acid Colitis with Calcitriol Is Associated with a Change of a T Helper (Th) 1/Th17 to a Th2 and Regulatory T Cell Profile. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 324, n. 1, p. 23–33, 5 Oct. 2007.

DAUBAIL, B. et al. Serum 25-hydroxyvitamin D predicts severity and prognosis in stroke patients. **European journal of neurology : the official journal of the European Federation of Neurological Societies**, v. 20, n. 1, p. 57–61, Jan. 2013.

DAUBAIL, B. et al. Association between serum concentration of vitamin D and 1-year mortality in stroke patients. **Cerebrovascular diseases (Basel, Switzerland)**, v. 37, n. 5, p. 364–7, Jan. 2014.

DAVIES, C. A. et al. The progression and topographic distribution of interleukin-1beta expression after permanent middle cerebral artery occlusion in the rat. **Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 19, n. 1, p. 87–98, Jan. 1999.

DE KEYSER, J. et al. Neuroprotection in acute ischemic stroke. **Acta neurologica Belgica**, v. 105, n. 3, p. 144–8, Sep. 2005.

DEGRABA, T. J. The role of inflammation after acute stroke: utility of pursuing anti-adhesion molecule therapy. **Neurology**, v. 51, n. 3 Suppl 3, p. S62–8, Sep. 1998.

DEL ZOPPO, G. et al. Inflammation and stroke: putative role for cytokines, adhesion molecules and iNOS in brain response to ischemia. **Brain pathology (Zurich, Switzerland)**, v. 10, n. 1, p. 95–112, Jan. 2000.

DEL ZOPPO, G. J.; HALLENBECK, J. M. Advances in the vascular pathophysiology of ischemic stroke. **Thrombosis research**, v. 98, n. 3, p. 73–81, 1 May 2000.

DHANDAPANI, K. M.; BRANN, D. W. Transforming growth factor-beta: a neuroprotective factor in cerebral ischemia. **Cell biochemistry and biophysics**, v. 39, n. 1, p. 13–22, Jan. 2003.

DI NAPOLI, M. et al. Evaluation of C-Reactive Protein Measurement for Assessing the Risk and Prognosis in Ischemic Stroke: A Statement for Health Care Professionals From the CRP Pooling Project Members. **Stroke**, v. 36, n. 6, p. 1316–1329, 5 May 2005.

DI NAPOLI, M.; PAPA, F.; BOCOLA, V. Prognostic influence of increased C-reactive protein and fibrinogen levels in ischemic stroke. **Stroke; a journal of cerebral circulation**, v. 32, n. 1, p. 133–8, Jan. 2001.

DIRNAGL, U.; IADECOLA, C.; MOSKOWITZ, M. A. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. **Trends in neurosciences**, v. 22, n. 9, p. 391–7, Sep. 1999.

DONG, J. et al. Calcitriol protects renovascular function in hypertension by down-regulating angiotensin II type 1 receptors and reducing oxidative stress. **European heart journal**, v. 33, n. 23, p. 2980–90, Dec. 2012.

DRECHSLER, C. et al. Vitamin D deficiency is associated with sudden cardiac death, combined cardiovascular events, and mortality in haemodialysis patients. **European heart journal**, v. 31, n. 18, p. 2253–61, Sep. 2010.

DURUP, D. et al. A Reverse J-Shaped Association Between Serum 25-Hydroxyvitamin D and Cardiovascular Disease Mortality: The CopD Study. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 100, n. 6, p. 2339–46, Jun. 2015.

EDWARDS, R. L.; RICKLES, F. R.; BOBROVE, A. M. Mononuclear cell tissue factor: cell of origin and requirements for activation. **Blood**, v. 54, n. 2, p. 359–70, Aug. 1979.

ERNST, E. et al. Leukocytes and the risk of ischemic diseases. **JAMA**, v. 257, n. 17, p. 2318–24, 1 May 1987.

EVERETT, B. M. et al. The relative strength of C-reactive protein and lipid levels as determinants of ischemic stroke compared with coronary heart disease in women. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 48, n. 11, p. 2235–42, 5 Dec. 2006.

EYLES, D. W. et al. Distribution of the vitamin D receptor and 1 alpha-hydroxylase in human brain. **Journal of chemical neuroanatomy**, v. 29, n. 1, p. 21–30, Jan. 2005.

FEUERSTEIN, G. Z.; WANG, X.; BARONE, F. C. The role of cytokines in the neuropathology of stroke and neurotrauma. **Neuroimmunomodulation**, v. 5, n. 3-4, p. 143–59, Jan. .

FONTAINE, L. et al. Molecular characterization and transcriptional analysis of adhE2, the gene encoding the NADH-dependent aldehyde/alcohol dehydrogenase responsible for butanol production in alcohologenic cultures of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. **Journal of bacteriology**, v. 184, n. 3, p. 821–30, Feb. 2002.

GABAY, C.; KUSHNER, I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. **The New England journal of medicine**, v. 340, n. 6, p. 448–54, 11 Feb. 1999.

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

GARCION, E. et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ inhibits the expression of inducible nitric oxide synthase in rat central nervous system during experimental allergic encephalomyelitis. **Brain research. Molecular brain research**, v. 45, n. 2, p. 255–67, May 1997.

GARCION, E. et al. Expression of inducible nitric oxide synthase during rat brain inflammation: regulation by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. **Glia**, v. 22, n. 3, p. 282–94, Mar. 1998.

GARCION, E. et al. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ regulates the synthesis of gamma-glutamyl transpeptidase and glutathione levels in rat primary astrocytes. **Journal of neurochemistry**, v. 73, n. 2, p. 859–66, Aug. 1999.

GARCION, E. et al. New clues about vitamin D functions in the nervous system. **Trends in endocrinology and metabolism: TEM**, v. 13, n. 3, p. 100–5, Apr. 2002.

GARDEN, G. A.; MÖLLER, T. Microglia biology in health and disease. **Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology**, v. 1, n. 2, p. 127–37, Jun. 2006.

GO, A. S. et al. Heart disease and stroke statistics--2014 update: a report from the American Heart Association. **Circulation**, v. 129, n. 3, p. e28–e292, 21 Jan. 2014.

GRAU, A. J. et al. Leukocyte count as an independent predictor of recurrent ischemic events. **Stroke; a journal of cerebral circulation**, v. 35, n. 5, p. 1147–52, May 2004.

GREGERSEN, R.; LAMBERTSEN, K.; FINSEN, B. Microglia and macrophages are the major source of tumor necrosis factor in permanent middle cerebral artery occlusion in mice. **Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 20, n. 1, p. 53–65, Jan. 2000.

GREGORI, S. et al. Regulatory T cells induced by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D₃ and mycophenolate mofetil treatment mediate transplantation tolerance. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 167, n. 4, p. 1945–53, 15 Aug. 2001.

GROSS, C. E. et al. Transforming growth factor-beta 1 reduces infarct size after experimental cerebral ischemia in a rabbit model. **Stroke**, v. 24, n. 4, p. 558–562, 1 Apr. 1993.

GUPTA, A. et al. Vitamin D status and risk of ischemic stroke in North Indian patients. **Indian journal of endocrinology and metabolism**, v. 18, n. 5, p. 721–5, Sep. 2014.

HALLENBECK, J. M. Inflammatory reactions at the blood-endothelial interface in acute stroke. **Advances in neurology**, v. 71, p. 281–97; discussion 297–300, Jan. 1996.

HANISCH, U.-K. Microglia as a source and target of cytokines. **Glia**, v. 40, n. 2, p. 140–55, Nov. 2002.

HENRICH-NOACK, P.; PREHN, J. H.; KRIEGLSTEIN, J. TGF-beta 1 protects hippocampal neurons against degeneration caused by transient global ischemia. Dose-response relationship and potential neuroprotective mechanisms. **Stroke; a journal of cerebral circulation**, v. 27, n. 9, p. 1609–14; discussion 1615, Sep. 1996.

HERRMANN, O. et al. Regulation of body temperature and neuroprotection by endogenous interleukin-6 in cerebral ischemia. **Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 23, n. 4, p. 406–15, Apr. 2003.

HEWISON, M. An update on vitamin D and human immunity. **Clinical endocrinology**, v. 76, n. 3, p. 315–25, Mar. 2012.

HIRT, L. et al. D-JNK11, a cell-penetrating c-Jun-N-terminal kinase inhibitor, protects against cell death in severe cerebral ischemia. **Stroke; a journal of cerebral circulation**, v. 35, n. 7, p. 1738–43, Jul. 2004.

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

HOLICK, M. F. et al. Guidelines for preventing and treating vitamin D deficiency and insufficiency revisited. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 97, n. 4, p. 1153–8, Apr. 2012.

HOLICK, M. F.; CHEN, T. C. Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. **The American journal of clinical nutrition**, v. 87, n. 4, p. 1080S–6S, Apr. 2008.

HOSOMI, N. et al. Tumor necrosis factor-alpha neutralization reduced cerebral edema through inhibition of matrix metalloproteinase production after transient focal cerebral ischemia. **Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 25, n. 8, p. 959–67, Aug. 2005.

HUANG, Y.-N. et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 attenuates endotoxin-induced production of inflammatory mediators by inhibiting MAPK activation in primary cortical neuron-glia cultures. **Journal of Neuroinflammation**, v. 12, n. 1, p. 147, 2015.

HYPPÖNEN, E. et al. 25-Hydroxyvitamin D and Pre-Clinical Alterations in Inflammatory and Hemostatic Markers: A Cross Sectional Analysis in the 1958 British Birth Cohort. **PLoS ONE**, v. 5, n. 5, p. e10801, 2010.

IADECOLA, C. et al. Cyclooxygenase-2 immunoreactivity in the human brain following cerebral ischemia. **Acta neuropathologica**, v. 98, n. 1, p. 9–14, Jul. 1999.

ISHIKAWA, M. et al. Inflammatory responses to ischemia and reperfusion in the cerebral microcirculation. **Frontiers in bioscience : a journal and virtual library**, v. 9, p. 1339–47, 1 May 2004.

JAMES, P. A. et al. 2014 evidence-based guideline for the management of high blood

pressure in adults: report from the panel members appointed to the Eighth Joint National Committee (JNC 8). **JAMA : the journal of the American Medical Association**, v. 311, n. 5, p. 507–20, 5 Feb. 2014.

JICKLING, G. C.; SHARP, F. R. Blood biomarkers of ischemic stroke. **Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics**, v. 8, n. 3, p. 349–60, Jul. 2011.

JONES, G. Pharmacokinetics of vitamin D toxicity. **The American journal of clinical nutrition**, v. 88, n. 2, p. 582S–586S, Aug. 2008.

KAPTOGE, S. et al. C-reactive protein concentration and risk of coronary heart disease, stroke, and mortality: an individual participant meta-analysis. **Lancet (London, England)**, v. 375, n. 9709, p. 132–40, 9 Jan. 2010.

KIM, J. S. Cytokines and adhesion molecules in stroke and related diseases. **Journal of the neurological sciences**, v. 137, n. 2, p. 69–78, May 1996.

KIMELBERG, H. K. Astrocytic swelling in cerebral ischemia as a possible cause of injury and target for therapy. **Glia**, v. 50, n. 4, p. 389–97, Jun. 2005.

KRISTAL-BONEH, E. et al. Association of calcitriol and blood pressure in normotensive men. **Hypertension**, v. 30, n. 5, p. 1289–94, Nov. 1997.

KUNADIAN, V. et al. Vitamin D deficiency and coronary artery disease: a review of the evidence. **American heart journal**, v. 167, n. 3, p. 283–91, Mar. 2014.

LADEBY, R. et al. Microglial cell population dynamics in the injured adult central nervous system. **Brain research. Brain research reviews**, v. 48, n. 2, p. 196–206, Apr. 2005.

LAI, A. Y.; TODD, K. G. Microglia in cerebral ischemia: molecular actions and interactions. **Canadian journal of physiology and pharmacology**, v. 84, n. 1, p. 49–59, Jan. 2006.

LAMBERTSEN, K. L. et al. Microglia protect neurons against ischemia by synthesis of tumor necrosis factor. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 29, n. 5, p. 1319–30, 4 Feb. 2009.

LANGUB, M. C. et al. Evidence of functional vitamin D receptors in rat hippocampus. **Neuroscience**, v. 104, n. 1, p. 49–56, Jan. 2001.

LEE, J. H. et al. Vitamin D deficiency an important, common, and easily treatable cardiovascular risk factor? **Journal of the American College of Cardiology**, v. 52, n. 24, p. 1949–56, 9 Dec. 2008.

LEGOS, J. J. et al. Quantitative changes in interleukin proteins following focal stroke in the rat. **Neuroscience letters**, v. 282, n. 3, p. 189–92, 24 Mar. 2000.

LEMIRE, J. M. et al. 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 suppresses proliferation and immunoglobulin production by normal human peripheral blood mononuclear cells. **Journal of Clinical Investigation**, v. 74, n. 2, p. 657–661, 1 Aug. 1984.

LI, Y. C. et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system. **The Journal of clinical investigation**, v. 110, n. 2, p. 229–38, 15 Jul. 2002.

LI, Y. C. Vitamin D regulation of the renin-angiotensin system. **Journal of cellular biochemistry**, v. 88, n. 2, p. 327–31, 1 Feb. 2003.

LIEFAARD, M. C. et al. Vitamin D and C-Reactive Protein: A Mendelian Randomization Study. **Plos One**, v. 10, n. 7, p. e0131740, 2015.

LIPS, P. Relative value of 25(OH)D and 1,25(OH)₂D measurements. **Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research**, v. 22, n. 11, p. 1668–71, Nov. 2007.

LIU, L. C. Y. et al. Vitamin D status and outcomes in heart failure patients. **European journal of heart failure**, v. 13, n. 6, p. 619–25, Jun. 2011.

LIU, T. et al. Tumor necrosis factor- α expression in ischemic neurons. **Stroke; a journal of cerebral circulation**, v. 25, n. 7, p. 1481–8, Jul. 1994.

MACLAUGHLIN, J.; HOLICK, M. F. Aging decreases the capacity of human skin to produce vitamin D₃. **Journal of Clinical Investigation**, v. 76, n. 4, p. 1536–1538, 1 Oct. 1985.

MAJUMDAR, V. et al. Vitamin D status, hypertension and ischemic stroke: a clinical perspective. **Journal of human hypertension**, 26 Mar. 2015.

MAKI, K. C. et al. Serum 25-hydroxyvitamin D is independently associated with high-density lipoprotein cholesterol and the metabolic syndrome in men and women. **Journal of clinical lipidology**, v. 3, n. 4, p. 289–96, Aug. 2009.

MANDARINO, N. R. et al. Is vitamin d deficiency a new risk factor for cardiovascular disease? **The open cardiovascular medicine journal**, v. 9, p. 40–9, Jan. 2015.

MANGIN, M.; SINHA, R.; FINCHER, K. Inflammation and vitamin D: the infection connection. **Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]**, v. 63, n. 10, p. 803–19, Oct. 2014.

MARNIEMI, J. et al. Dietary and serum vitamins and minerals as predictors of myocardial infarction and stroke in elderly subjects. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 15, n. 3, p. 188–197, 2005.

MATHIEU, C. Vitamin D and the immune system: Getting it right. **IBMS BoneKEy**, v. 8, n. 4, p. 178–186, 1 Apr. 2011.

MARTINS, D. et al. Prevalence of cardiovascular risk factors and the serum levels of 25-hydroxyvitamin D in the United States: data from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. **Archives of internal medicine**, v. 167, n. 11, p. 1159–65, 11 Jun. 2007.

MATSUOKA, L. Y. et al. Sunscreens suppress cutaneous vitamin D₃ synthesis. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 64, p. 1165–1168, 1987.

MCCOY, M. K.; TANSEY, M. G. TNF signaling inhibition in the CNS: implications for normal brain function and neurodegenerative disease. **Journal of neuroinflammation**, v. 5, p. 45, Jan. 2008.

MICHOS, E. D. et al. 25-Hydroxyvitamin D deficiency is associated with fatal stroke among whites but not blacks: The NHANES-III linked mortality files. **Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)**, v. 28, n. 4, p. 367–71, Apr. 2012.

MORITA, A.; NAKAYAMA, T.; SOMA, M. Association Study Between C-Reactive Protein Genes and Ischemic Stroke in Japanese Subjects. **American Journal of Hypertension**, v. 19, n. 6, p. 593–600, 2006.

MOSEKILDE, L. Vitamin D and the elderly. **Clinical Endocrinology**, v. 62, n. 3, p. 265–281, Mar. 2005.

MOZOS, I.; MARGINEAN, O. Links between Vitamin D Deficiency and Cardiovascular Diseases. v. 2015, 2015.

NASI, L. A. **Rotinas em Unidade Vascular**. [s.l.] Artmed Editora, 2009.

NATIONAL CHOLESTEROL EDUCATION PROGRAM (NCEP) EXPERT PANEL ON DETECTION, EVALUATION, AND T. OF H. B. C. IN A. (ADULT T. P. I. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. **Circulation**, v. 106, n. 25, p. 3143–421, 17 Dec. 2002.

NAVEILHAN, P. et al. Expression of 25(OH) vitamin D3 24-hydroxylase gene in glial cells. **Neuroreport**, v. 5, n. 3, p. 255–7, 13 Dec. 1993.

NAVEILHAN, P. et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3, an inducer of glial cell line-derived neurotrophic factor. **Neuroreport**, v. 7, n. 13, p. 2171–5, 2 Sep. 1996.

NIGWEKAR, S. U.; THADHANI, R. Vitamin D receptor activation: cardiovascular and renal implications. **Kidney international supplements**, v. 3, n. 5, p. 427–430, Dec. 2013.

NILUPUL PERERA, M. et al. Inflammation following stroke. **Journal of clinical neuroscience : official journal of the Neurosurgical Society of Australasia**, v. 13, n. 1, p. 1–8, Jan. 2006.

NORMAN, P. E.; POWELL, J. T. Vitamin D, shedding light on the development of disease in peripheral arteries. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 25, n. 1, p. 39–46, 1 Jan. 2005.

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

OVERBERGH, L. et al. 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 induces an autoantigen-specific T-helper 1/T-helper 2 immune shift in NOD mice immunized with GAD65 (p524-543). **Diabetes**, v. 49, n. 8, p. 1301–7, Aug. 2000.

PALACIOS, C.; GONZALEZ, L. Is vitamin D deficiency a major global public health problem?

The Journal of steroid biochemistry and molecular biology, v. 144 Pt A, p. 138–45, Oct. 2014.

PANTONI, L.; SARTI, C.; INZITARI, D. Cytokines and cell adhesion molecules in cerebral ischemia: experimental bases and therapeutic perspectives. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 18, n. 4, p. 503–13, Apr. 1998.

PARDRIDGE, W. M.; SAKIYAMA, R.; COTY, W. A. Restricted transport of vitamin D and A derivatives through the rat blood-brain barrier. **Journal of neurochemistry**, v. 44, n. 4, p. 1138–41, Apr. 1985.

PARK, K.-Y. et al. Serum Vitamin D Status as a Predictor of Prognosis in Patients with Acute Ischemic Stroke. **Cerebrovascular Diseases**, v. 40, n. 1-2, p. 73–80, 11 Jul. 2015.

PENNA, G. et al. Expression of the inhibitory receptor ILT3 on dendritic cells is dispensable for induction of CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3. **Blood**, v. 106, n. 10, p. 3490–7, 15 Nov. 2005.

PÉREZ-DE PUIG, I. et al. IL-10 deficiency exacerbates the brain inflammatory response to permanent ischemia without preventing resolution of the lesion. **Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 33, n. 12, p. 1955–66, Dec. 2013.

PETERS, S. A. E.; HUXLEY, R. R.; WOODWARD, M. Smoking as a risk factor for stroke in women compared with men: a systematic review and meta-analysis of 81 cohorts, including 3,980,359 individuals and 42,401 strokes. **Stroke; a journal of cerebral circulation**, v. 44, n. 10, p. 2821–8, Oct. 2013.

PETTY, M. A.; WETTSTEIN, J. G. Elements of cerebral microvascular ischaemia. **Brain research. Brain research reviews**, v. 36, n. 1, p. 23–34, Aug. 2001.

PIKE, J. W. et al. Molecular actions of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on genes involved in calcium homeostasis. **Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research**, v. 22 Suppl 2, p. V16–9, Dec. 2007.

PILZ, S. et al. Low vitamin d levels predict stroke in patients referred to coronary angiography. **Stroke; a journal of cerebral circulation**, v. 39, n. 9, p. 2611–3, Sep. 2008.

PILZ, S. et al. Vitamin D status and arterial hypertension: a systematic review. **Nature reviews. Cardiology**, v. 6, n. 10, p. 621–30, Oct. 2009.

PILZ, S. et al. The role of vitamin D deficiency in cardiovascular disease: where do we stand in 2013? **Archives of toxicology**, v. 87, n. 12, p. 2083–103, Dec. 2013.

PROSSER, D. E.; JONES, G. Enzymes involved in the activation and inactivation of vitamin D. **Trends in biochemical sciences**, v. 29, n. 12, p. 664–73, Dec. 2004.

PROTTI, G. G. et al. Interleukin-10 may protect against progressing injury during the acute phase of ischemic stroke. **Arquivos de neuro-psiquiatria**, v. 71, n. 11, p. 846–51, Nov. 2013.

- PRÜFER, K. et al. Distribution of 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor immunoreactivity in the rat brain and spinal cord. **Journal of chemical neuroanatomy**, v. 16, n. 2, p. 135–45, Feb. 1999.
- RAIVICH, G. et al. Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. **Brain research. Brain research reviews**, v. 30, n. 1, p. 77–105, Jul. 1999.
- RALLIDIS, L. S. et al. Inflammatory markers and in-hospital mortality in acute ischaemic stroke. **Atherosclerosis**, v. 189, n. 1, p. 193–7, 11 Nov. 2006.
- RENNA, R. et al. Risk factor and etiology analysis of ischemic stroke in young adult patients. **Journal of stroke and cerebrovascular diseases : the official journal of National Stroke Association**, v. 23, n. 3, p. e221–7, Mar. 2014.
- RESNICK, L. M.; MÜLLER, F. B.; LARAGH, J. H. Calcium-regulating hormones in essential hypertension. Relation to plasma renin activity and sodium metabolism. **Annals of internal medicine**, v. 105, n. 5, p. 649–54, Nov. 1986.
- ROSAMOND, W. et al. Heart disease and stroke statistics--2008 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. **Circulation**, v. 117, n. 4, p. e25–146, 29 Jan. 2008.
- ROSELL, A. et al. MMP-9-positive neutrophil infiltration is associated to blood-brain barrier breakdown and basal lamina type IV collagen degradation during hemorrhagic transformation after human ischemic stroke. **Stroke; a journal of cerebral circulation**, v. 39, n. 4, p. 1121–6, Apr. 2008.
- ROSS, A. C. et al. Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D. 2011.
- ROST, N. S. et al. Plasma concentration of C-reactive protein and risk of ischemic stroke and transient ischemic attack: the Framingham study. **Stroke; a journal of cerebral circulation**, v. 32, n. 11, p. 2575–9, Nov. 2001.
- ROSTKOWSKA-NADOLSKA, B. et al. Vitamin D derivatives: calcitriol and tacalcitol inhibits interleukin-6 and interleukin-8 expression in human nasal polyp fibroblast cultures. **Advances in medical sciences**, v. 55, n. 1, p. 86–92, Jan. 2010.
- ROTHWELL, N. J.; LUHESHI, G. N. Interleukin 1 in the brain: biology, pathology and therapeutic target. **Trends in neurosciences**, v. 23, n. 12, p. 618–25, Dec. 2000.
- SADEGHI, K. et al. Vitamin D3 down-regulates monocyte TLR expression and triggers hyporesponsiveness to pathogen-associated molecular patterns. **European journal of immunology**, v. 36, n. 2, p. 361–70, Mar. 2006.
- SHAAFI, S. et al. Interleukin-6, a reliable prognostic factor for ischemic stroke. **Iranian journal of neurology**, v. 13, n. 2, p. 70–6, 3 Apr. 2014.
- SHEA, M. K. et al. Vitamin K and vitamin D status: associations with inflammatory markers in the Framingham Offspring Study. **American journal of epidemiology**, v. 167, n. 3, p. 313–20,

1 Mar. 2008.

SIMI, A. et al. Interleukin-1 and inflammatory neurodegeneration. **Biochemical Society transactions**, v. 35, n. Pt 5, p. 1122–6, Nov. 2007.

SINGH, A. S. et al. Role of erythrocyte sedimentation rate in ischemic stroke as an inflammatory marker of carotid atherosclerosis. **Journal of neurosciences in rural practice**, v. 5, n. 1, p. 40–5, Jan. 2014.

SMITH, C. J. et al. Peak plasma interleukin-6 and other peripheral markers of inflammation in the first week of ischaemic stroke correlate with brain infarct volume, stroke severity and long-term outcome. **BMC neurology**, v. 4, p. 2, 15 Jan. 2004.

SMOLDERS, J. et al. Vitamin D Status Is Positively Correlated with Regulatory T Cell Function in Patients with Multiple Sclerosis. **PLoS ONE**, v. 4, n. 8, p. e6635, 13 Aug. 2009.

SPERA, P. A. et al. IL-10 reduces rat brain injury following focal stroke. **Neuroscience letters**, v. 251, n. 3, p. 189–92, 31 Jul. 1998.

SRIRAM, K.; O'CALLAGHAN, J. P. Divergent roles for tumor necrosis factor-alpha in the brain. **Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology**, v. 2, n. 2, p. 140–53, Jun. 2007.

STEPHENSON, D. et al. Transcription factor nuclear factor-kappa B is activated in neurons after focal cerebral ischemia. **Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 20, n. 3, p. 592–603, Mar. 2000.

STREIT, W. J.; WALTER, S. A.; PENNELL, N. A. Reactive microgliosis. **Progress in neurobiology**, v. 57, n. 6, p. 563–81, Apr. 1999.

SUGHRUE, M. E. et al. Anti-adhesion molecule strategies as potential neuroprotective agents in cerebral ischemia: a critical review of the literature. **Inflammation research**, v. 53, n. 10, p. 497–508, Oct. 2004.

SUN, Q. et al. 25-Hydroxyvitamin D Levels and the Risk of Stroke: A Prospective Study and Meta-analysis. **Stroke**, v. 43, n. 6, p. 1470–1477, 2012.

TARCIN, O. et al. Effect of Vitamin D Deficiency and Replacement on Endothelial Function in Asymptomatic Subjects. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 94, n. 10, p. 4023–4030, 2009.

TIMMS, P. M. et al. Circulating MMP9, vitamin D and variation in the TIMP-1 response with VDR genotype: Mechanisms for inflammatory damage in chronic disorders? **QJM - Monthly Journal of the Association of Physicians**, v. 95, n. 12, p. 787–796, 2002.

TRANG, H. M. et al. Evidence that vitamin D3 increases serum 25-hydroxyvitamin D more efficiently than does vitamin D2. **The American journal of clinical nutrition**, v. 68, n. 4, p. 854–8, Oct. 1998.

- TU, W.-J. et al. Serum 25-hydroxyvitamin D predicts the short-term outcomes of Chinese patients with acute ischaemic stroke. **Clinical science (London, England : 1979)**, v. 126, n. 5, p. 339–46, Mar. 2014.
- VAN ETEN, E.; MATHIEU, C. Immunoregulation by 1,25-dihydroxyvitamin D₃: basic concepts. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 97, n. 1-2, p. 93–101, Oct. 2005.
- VAN EXEL, E. et al. Inflammation and Stroke: The Leiden 85-Plus Study. **Stroke**, v. 33, n. 4, p. 1135–1138, 1 Apr. 2002.
- VILA, N. et al. Proinflammatory cytokines and early neurological worsening in ischemic stroke. **Stroke; a journal of cerebral circulation**, v. 31, n. 10, p. 2325–9, Oct. 2000.
- WANG, J. Y. et al. Vitamin D(3) attenuates 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in rats. **Brain research**, v. 904, n. 1, p. 67–75, 2001.
- WANG, Q.; TANG, X. N.; YENARI, M. A. The inflammatory response in stroke. **Journal of neuroimmunology**, v. 184, n. 1-2, p. 53–68, Mar. 2007.
- WANG, T. J. et al. Vitamin D deficiency and risk of cardiovascular disease. **Circulation**, v. 117, n. 4, p. 503–11, 29 Jan. 2008.
- WANG, Y. et al. Prognostic Value of Serum 25-Hydroxyvitamin D in Patients with Stroke. **Neurochemical Research**, v. 39, n. 7, p. 1332–1337, 2014.
- WHITE, J. H. Vitamin D metabolism and signaling in the immune system. **Reviews in endocrine & metabolic disorders**, v. 13, n. 1, p. 21–9, Mar. 2012.
- WON, S. et al. Vitamin D prevents hypoxia/reoxygenation-induced blood-brain barrier disruption via vitamin D receptor-mediated NF- κ B signaling pathways. **PloS one**, v. 10, n. 3, p. e0122821, Jan. 2015.
- WU, T.-H. et al. Total white blood cell count or neutrophil count predict ischemic stroke events among adult Taiwanese: report from a community-based cohort study. **BMC neurology**, v. 13, p. 7, Jan. 2013.
- WU-WONG, J. R.; NAKANE, M.; MA, J. Vitamin D analogs modulate the expression of plasminogen activator inhibitor-1, thrombospondin-1 and thrombomodulin in human aortic smooth muscle cells. **Journal of vascular research**, v. 44, n. 1, p. 11–8, Jan. 2007.
- XUE, M.-L. et al. 1 alpha,25-Dihydroxyvitamin D₃ inhibits pro-inflammatory cytokine and chemokine expression in human corneal epithelial cells colonized with *Pseudomonas aeruginosa*. **Immunology and cell biology**, v. 80, n. 4, p. 340–5, Aug. 2002.
- ZAREMBA, J.; SKROBAŃSKI, P.; LOSY, J. Acute ischaemic stroke increases the erythrocyte sedimentation rate, which correlates with early brain damage. **Folia morphologica**, v. 63, n. 4, p. 373–6, Nov. 2004.
- ZHANG, Y. et al. Vitamin D inhibits monocyte/macrophage proinflammatory cytokine

production by targeting MAPK phosphatase-1. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 188, n. 5, p. 2127–35, 1 Mar. 2012.

ZHOU, Y. et al. Hs-CRP in stroke: A meta-analysis. **Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry**, v. 453, p. 21–27, 26 Nov. 2015.

ZHU, J. et al. GATA-3 promotes Th2 responses through three different mechanisms: induction of Th2 cytokine production, selective growth of Th2 cells and inhibition of Th1 cell-specific factors. **Cell research**, v. 16, n. 1, p. 3–10, Jan. 2006.

ZHU, Y. et al. The expression of transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) in hippocampal neurons: a temporary upregulated protein level after transient forebrain ischemia in the rat. **Brain research**, v. 866, n. 1-2, p. 286–98, 2 Jun. 2000.

ZOU, J. Y.; CREWS, F. T. TNF alpha potentiates glutamate neurotoxicity by inhibiting glutamate uptake in organotypic brain slice cultures: neuroprotection by NF kappa B inhibition. **Brain research**, v. 1034, n. 1-2, p. 11–24, 9 Feb. 2005.

ANEXOS

ANEXO 1 – APROVAÇÃO PELO COMITE DE ÉTICA EM PESQUISA 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 |



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 |
| <p>Prezado(a) Senhor(a):</p> <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> | |
| <p>Situação do Projeto: APROVADO</p> <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> | |
| <p>Londrina, 20 de dezembro de 2011.</p> <p></p> <p>Prof. Dra. Alexandrina Aparecida Maciel Cardelli Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos Universidade Estadual de Londrina</p> | |

APÊNDICE

APÊNDICE 1A- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA GRUPO DE PACIENTES COM AVC

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

Prezado (a) Senhor (a):

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

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

Os benefícios esperados são que caso a hipótese da pesquisa seja confirmada, estes resultados poderão agilizar e facilitar os tratamentos disponíveis para um derrame. O sangue que será coletado para a pesquisa será parte da mesma coleta de exames de rotina que será

realizada independentemente de sua participação ou não no estudo e desta forma, não vos acarreta em nenhum risco adicional.

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

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

Londrina, ___ de _____ de 20__.

Pesquisador Responsável: Dr. Márcio Francisco Lehmann, médico,

CRM/PR 16.049. RG 4.481.314-9 SSP/PR, fone: 43 - 9928 5518,

e-mail: mflehmann@hotmail.com

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

Assinatura (ou impressão dactiloscópica): _____

Data: _____

APÊNDICE 1B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA GRUPO DE CONTROLES

“RESPOSTA INFLAMATÓRIA E IMUNOLÓGICA NOS PACIENTES COM ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL ISQUÊMICO AGUDO E SUA RELAÇÃO COM O DEFICIT NEUROLÓGICO E EVOLUÇÃO CLÍNICA”

Prezado (a) Senhor (a):

Gostaríamos de convidá-lo a participar da pesquisa: **“RESPOSTA INFLAMATÓRIA E IMUNOLÓGICA NOS PACIENTES COM ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL ISQUÊMICO AGUDO E SUA RELAÇÃO COM O DEFICIT NEUROLÓGICO E EVOLUÇÃO CLÍNICA”**, realizada no Hospital Universitário de Londrina. O objetivo da pesquisa é saber se existe algum exame de sangue que possa indicar de forma mais rápida e simples sinais de que um acidente vascular cerebral (AVC ou derrame no cérebro) tem maiores riscos de evoluir de maneira desfavorável. A sua participação é muito importante e ela se daria da seguinte forma: coleta de amostra de sangue (20 ml) no dia de sua entrada no hospital. Gostaríamos de esclarecer que sua participação é totalmente voluntária, podendo você: recusar-se a participar, ou mesmo desistir a qualquer momento sem que isto acarrete qualquer ônus ou prejuízo à sua pessoa. Informamos ainda que as informações serão utilizadas somente para os fins desta pesquisa e serão tratadas com o mais absoluto sigilo e confidencialidade, de modo a preservar a sua identidade.

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

Os benefícios esperados são que caso a hipótese da pesquisa seja confirmada, estes resultados poderão agilizar e facilitar os tratamentos disponíveis para um derrame. O sangue que será coletado para a pesquisa será parte da mesma coleta de exames de rotina que será realizada independentemente de sua participação ou não no estudo e desta forma, não vos acarreta em nenhum risco adicional.

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

Caso você tenha dúvidas ou necessite de maiores esclarecimentos pode nos contatar **Dr. Márcio Francisco Lehmann, Av. Robert Koch 60, 3371-2000**, ou procurar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, na Avenida Robert Koch, nº 60, ou no telefone 3371-2490. Este termo deverá ser preenchido em duas vias de igual teor, sendo uma delas, devidamente preenchida e assinada entregue a você.

Londrina, ___ de _____ de 20__.

**Pesquisador Responsável: Dr. Márcio Francisco Lehmann, médico,
CRM/PR 16.049. RG 4.481.314-9 SSP/PR.**

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

Assinatura (ou impressão dactiloscópica): _____

Data: _____

APÊNDICE 1C - QUESTIONÁRIO PARA COLETA DE DADOS PACIENTES E CONTROLES

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

Projeto de Pesquisa aprovado pelo CEP/UEL, Protocolo 19382/10,

CAE 0176.0.268.000-10

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

IDENTIFICAÇÃO

Nome: _____ ID _____

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

Antecedentes Mórbidos Pessoais: () HAS () DM
 () Dislipidemia () Sedentarismo
 () Dça Autoimune () Dça Hematológica
 () Dça Infeciosa () AVC () IAM

Outros: _____

Medicamentos de uso contínuo: _____

() Uso de antioxidantes () Uso de vitaminas Outros _____

Antecedentes Mórbidos Familiares: () HAS () DM () Dislipidemia
 () AVC () IAM () Outro: _____

Condições e hábitos de vida: () Tabagismo () Etilismo () Sedentarismo

Historia Clínica e Exame Físico da Entrada (*baseline*):

Peso (Kg) _____ Altura (m) _____

Pressão arterial (mmHg) _____ Circunferência abdominal (cm) _____

Atividade física:

() SIM () 1x semana () 2x semana () 3x semana () > 3 x semana

() NÃO

Escala de Rankin Modificada

0- Nenhum sintoma

1- Não apresenta incapacidade significativa, apenas sintomas; capaz de realizar as obrigações e atividades habituais

2- Leve incapacidade; incapaz de realizar todas as atividades prévias, porém capaz de realizar os cuidados consigo próprio sem assistência.

3- Moderada incapacidade; necessita alguma ajuda, consegue andar sem ajuda

4- Moderada /ou severa incapacidade; incapaz de andar sem assistência e não consegue realizar sozinho os cuidados consigo próprio

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

6- Morte

TOTAL (0-6): _____