



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

DANIELA FRIZON ALFIERI

**ESTUDO DE BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS, METABÓLICOS, DE  
ESTRESSE OXIDATIVO E GENÉTICOS EM PACIENTES COM ACIDENTE  
VASCULAR ENCEFÁLICO ISQUÊMICO AGUDO**

DANIELA FRIZON ALFIERI

**ESTUDO DE BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS, METABÓLICOS, DE  
ESTRESSE OXIDATIVO E GENÉTICOS EM PACIENTES COM ACIDENTE  
VASCULAR ENCEFÁLICO ISQUÊMICO AGUDO**

Tese de Doutorado 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 Doutora.

Orientadora: Profa. Dra. Edna Maria Vissoci Reiche

Co-orientadora: Prof. Dra. Andrea Name Colado Simão

Londrina  
2019

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

Alfieri, Daniela Frizon.

Estudo de biomarcadores inflamatórios, metabólicos, de estresse oxidativo e genéticos em pacientes com acidente vascular encefálico isquêmico agudo / Daniela Frizon Alfieri. - Londrina, 2019.  
138 f. : il.

Orientador: Edna Maria Vissoci Reiche.

Coorientador: Andréa Name Colado Simão.

Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, , 2019.

Inclui bibliografia.

1. Acidente vascular encefálico isquêmico - Tese. 2. Polimorfismo genético - Tese. 3. Proteína C-reativa - Tese. 4. Inflamação - Tese. I. Vissoci Reiche, Edna Maria . II. Name Colado Simão, Andréa. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. . IV. Título.

DANIELA FRIZON ALFIERI

**ESTUDO DE BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS, METABÓLICOS, DE ESTRESSE  
OXIDATIVO E GENÉTICOS EM PACIENTES COM ACIDENTE VASCULAR  
ENCEFÁLICO ISQUÊMICO AGUDO**

Tese de Doutorado 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 Doutora.

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

Profa. Dra. Marla Karine Amarante  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dr. Marcio Francisco Lehmann  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Profa. Dra. Sayonara Rangel Oliveira  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

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

Londrina, 26 de fevereiro de 2019.

## 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 dedicação, cuidado, carinho e paciência em me orientar, e que além disso, confiou em mim e nunca soltou minha mão ao longo destes 9 anos, me mostrando sempre a paixão e a ética pela profissão.

À professora Dra. Elaine Regina Delicato de Almeida, com seu jeito meigo e doce, me ajudou e soube me aconselhar, de maneira sábia, em todos os momentos.

Ao professor Dr. Marcell Alysson Batisti Lozovoy e Dr Márcio Francisco Lehmann, e em especial à professora Dra. Andrea Name Colado Simão que sempre estiveram à disposição para me ensinar e me co-orientar. Além disso, sou grata à Prof. Dra Andrea por ter proporcionado inúmeras oportunidades em que fui capaz de crescer pessoalmente e profissionalmente.

À Maria Caroline de Araújo, que me surpreende a cada dia mais pela sua paixão à medicina e o carinho pelos pacientes.

Aos colegas e amigos de laboratório que auxiliaram direta e indiretamente na minha formação e conclusão deste trabalho.

Aos funcionários do Setor de Imunologia Clínica do Laboratório de Análises Clínicas do HU, muito obrigada pela atenção e carinho com que sempre fui recebida por vocês.

Aos pacientes e seus familiares que, mesmo em momento de dor, gentilmente aceitaram participar do estudo.

Agradecimentos especiais ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, do Centro de Ciências da Saúde da UEL, pela oportunidade e apoio para a realização do curso de doutorado; À Coordenação e Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) do Ministério da Educação do Brasil pelo apoio financeiro na concessão de bolsa de auxílio para o desenvolvimento da minha capacitação.

1 ALFIERI, Daniela Frizon. **Estudo de biomarcadores inflamatórios, metabólicos, de estresse**  
2 **oxidativo e genéticos em pacientes com acidente vascular encefálico isquêmico agudo.**  
3 2019. 138 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina,  
4 Londrina, 2019.

## 5 6 7 **RESUMO** 8 9

10 **Introdução:** O acidente vascular encefálico isquêmico (AVEi) agudo é uma das principais  
11 causas de morte e incapacidade em todo o mundo. É uma doença complexa e apresenta  
12 interação entre fatores não modificáveis (sexo, idade, genético) e modificáveis (hipertensão,  
13 dislipidemia, diabetes mellitus tipo 2, obesidade, tabagismo, entre outros). As vias  
14 inflamatória, metabólica e de estresse oxidativo e nitrosativo (IMO&NS) têm um papel  
15 importante durante o AVEi agudo e estão correlacionadas com a gravidade do evento e o  
16 prognóstico do paciente. Muitos biomarcadores inflamatórios têm sido considerados úteis  
17 no auxílio ao diagnóstico e prognóstico do AVEi, sendo a Proteína C reativa (PCR) um dos  
18 mais amplamente utilizados na prática clínica. Estudos sugerem uma associação entre  
19 variantes no gene da PCR, como o rs1130864, em que há maior produção de PCR e risco para  
20 AVEi. No entanto, resultados inconsistentes em relação a este polimorfismo têm sido  
21 descritos e muitos destes estudos têm sido realizados em populações etnicamente  
22 homogêneas. Além disto, até presente data, não temos conhecimento da avaliação  
23 concomitante destes biomarcadores de IMO&NS em pacientes com AVEi agudo na  
24 população brasileira. **Objetivo:** O objetivo deste estudo foi avaliar os biomarcadores  
25 IMO&NS e o polimorfismo rs1130864 no gene da *PCR* que possam prever a suscetibilidade  
26 ao AVEi agudo, assim como a incapacidade funcional na admissão e o prognóstico a curto  
27 prazo. **Métodos:** O estudo incluiu 176 pacientes com AVEi agudo atendidos no Pronto  
28 Socorro do Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, e  
29 176 controles sem histórico de AVEi e infarto agudo do miocárdio. Foram coletados dados  
30 demográficos, antropométricos, epidemiológicos e clínicos. Os subtipos de AVEi foram  
31 classificados segundo os critérios de TOAST em 5 categorias: aterosclerose de grandes  
32 artérias (LAAS), lacunar (LAC), cardioembólico (CEI), outras etiologias (ODE) e etiologia  
33 indeterminada (UDE). A incapacidade funcional dos pacientes foi avaliada no momento da  
34 admissão e após três meses de evolução pela Escala de Rankin Modificada (mRS). Amostras  
35 de sangue periférico foram coletadas em até 24 horas após o diagnóstico de AVEi para a  
36 determinação de biomarcadores inflamatórios, tais como contagem de leucócitos periféricos  
37 e plaquetas, velocidade de hemossedimentação (VHS), níveis séricos de PCR por  
38 metodologia de alta sensibilidade (usPCR), ferritina, fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$ ,  
39 interleucina (IL)-6, IL-10, 25-hidroxitamina D [25(OH)D] e homocisteína; glicose, insulina,  
40 colesterol total (CT), lipoproteína de baixa densidade (LDL) e lipoproteína de alta densidade  
41 (HDL) e triglicerídeos (TG) para os biomarcadores metabólicos; peroxidação lipídica  
42 (hidroperóxidos) e metabólitos do óxido nítrico (NOx) para os biomarcadores de estresse  
43 oxidativo e nitrosativo, respectivamente. Para identificação dos genótipos do rs1130864, o  
44 DNA genômico foi extraído das células do sangue periférico e uma sequência de 744 pares  
45 de bases do gene *PCR* foi amplificado pela reação em cadeia da polimerase (PCR). O produto  
46 obtido pela PCR foi submetido à digestão com a enzima de restrição *HpyCH4III* e analisado  
47 pelo método do polimorfismo no comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP).

1 **Resultados:** Os resultados obtidos foram apresentados e discutidos em dois artigos originais.  
2 Para o primeiro artigo científico, foram incluídos 176 pacientes e 176 controles. Todos os  
3 resultados foram ajustados para possíveis efeitos de variáveis ou covariáveis em análises  
4 multivariadas. Modelos lineares gerais (GLM) com todos os IMO&NS e dados  
5 demográficos/clínicos mostraram que o melhor conjunto de preditores para AVEi agudo foi  
6 sexo (masculino), pressão arterial sistólica, glicose, NOx, hidroperóxidos, IL-6, leucócitos  
7 periféricos (todos positivamente associados) e 25(OH)D (negativamente associado)  
8 ( $p<0,001$ ). Na análise multivariada, sexo (homens) ( $p<0,001$ ), hipertensão ( $p<0,001$ ),  
9 tabagismo ( $p=0,015$ ) e usPCR ( $p<0,001$ ) foram estimados como preditores independentes  
10 AVEi. Com este conjunto de biomarcadores, 89,4% de todos os pacientes com AVEi foram  
11 corretamente classificados com sensibilidade de 86,2% e especificidade de 93,0%. Na  
12 admissão do estudo, os valores de ferritina, IL-6, usPCR, leucócitos periféricos, VHS e glicose  
13 foram maiores entre aqueles com maior incapacidade ( $mRS\geq 3$ ) ( $p<0,001$ ). Além disso, níveis  
14 elevados de ferritina, IL-6, usPCR, VHS e glicose e menores níveis de 25(OH)D foram  
15 independentemente associados com pior prognóstico ( $mRS\geq 3$ ) após 3 meses ( $p<0,001$ ). Para  
16 o segundo artigo, foram analisados 168 pacientes e 166 controles. A mediana (intervalo  
17 interquartil) da usPCR foi de 7,5 mg/L (2,6-24,8) em pacientes com AVEi e 1,6 (0,7-3,7)  
18 mg/L em controles ( $p<0,001$ ). A distribuição dos genótipos do rs1130864 estava em  
19 equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $p>0,05$ ). Nos pacientes, a frequência dos genótipos CC, CT e  
20 TT foi de 95 (56,55%), 60 (35,71%) e 13 (7,74%), respectivamente. No grupo controle, a  
21 frequência destes genótipos foi de 91 (54,58%), 63 (37,95%) e 12 (7,23%), respectivamente.  
22 Não foram observadas diferenças na distribuição do genótipo rs1130864 entre pacientes e  
23 controles; além disso, os genótipos não foram associados às características epidemiológicas  
24 e clínicas, assim como à usPCR e outros biomarcadores inflamatórios no início do estudo em  
25 pacientes com AVEi ( $p>0,05$ ). Por outro lado, controles portadores do alelo T (genótipos CT +  
26 TT) apresentaram maiores níveis de usPCR ( $p=0,005$ ) e maior frequência de usPCR  $\geq 3$  mg/L  
27 que os portadores do genótipo CC [*odds ratio* (OR): 2,031; intervalo de confiança (IC) 95%:  
28 1,01- 4,10,  $p=0,045$ ]. Além disso, a idade, os valores de mRS no início do estudo e a usPCR  
29 contribuíram positivamente para o pior prognóstico ( $mRS\geq 3$ ) após três meses apenas em  
30 pacientes portadores do alelo T ( $p<0,001$ ). **Conclusão:** Estes resultados sugerem que um  
31 conjunto de biomarcadores IMO&NS pode ser útil para o auxílio na previsão da ocorrência  
32 de AVEi, assim como na avaliação precoce do prognóstico a curto prazo. Além disso, a  
33 variante localizada no gene *PCR*, rs1130864, por si só, não se mostrou um fator  
34 determinante para a susceptibilidade ao AVEi; no entanto, em pacientes portadores do alelo  
35 T, os níveis de usPCR foram preditores independentes para um pior desfecho após três  
36 meses do evento isquêmico.

37

38 **Palavras-chave:** Acidente vascular encefálico isquêmico. Inflamação. Polimorfismo  
39 genético. Proteína C-reativa. Prognóstico.

1 ALFIERI, Daniela Frizon. **Study of inflammatory, metabolic, oxidative stress and genetic**  
2 **biomarkers in patients with acute ischemic stroke.** 2019. 130 p. Thesis (Doctorate degree in  
3 Health Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

4  
5  
6 **ABSTRACT**  
7  
8

9 **Introduction:** Acute ischemic stroke (AIS) is one of the leading causes of death and disability  
10 worldwide. It is a complex disease and presents interaction between unmodifiable risk  
11 factors (sex, age, genetic) and modifiable risk factors (hypertension, dyslipidemia, diabetes  
12 mellitus type 2, obesity, smoking, among others). The inflammatory, metabolic, oxidative  
13 and nitrosative (IMO&NS) pathways play an important role during AIS and are correlated  
14 with patient severity and prognosis. Many inflammatory biomarkers have been found to be  
15 useful in helping the diagnosis and prognosis of AIS, with C-reactive protein (CRP) being one  
16 of the most widely used in clinical practice. Studies suggest an association between *CRP* gene  
17 variants, such as rs1130864, in which there is increased production of CRP and risk for  
18 stroke. However, inconsistent results in relation to this polymorphism have been described  
19 and many of these studies have been performed in ethnically homogenous populations. In  
20 addition, to date, we are not aware of the concomitant evaluation of these biomarkers of  
21 IMO&NS in patients with AIS in the Brazilian population. **Objective:** The objective of this  
22 study was to evaluate the IMO&NS biomarkers and the PCR rs1130864 variant that can be  
23 useful to predict susceptibility to AIS, as well as the functional disability at admission and  
24 short-term outcome. **Methods:** The study included 176 patients with AIS treated at the  
25 Emergency Room of the University Hospital of the State University of Londrina, Londrina,  
26 Paraná, and 176 controls with no history of AIS and acute myocardial infarction.  
27 Demographic, anthropometric, epidemiological and clinical data were collected. The AIS  
28 subtypes were classified according to the TOAST criteria in five categories: large artery  
29 atherosclerosis (LAAS), lacunar (LAC), cardioembolic (CEI), other etiologies (ODE) and  
30 undetermined etiology (UDE). The functional disability of the patients was evaluated at the  
31 time of admission and after three-months follow-up using the modified Rankin Scale (mRS).  
32 Peripheral blood samples were collected up to 24 hours after the diagnosis of AIS for the  
33 determination of inflammatory biomarkers, such as peripheral leukocyte and platelet  
34 counts, erythrocyte sedimentation rate (ESR), serum levels of CRP using high sensitivity assay  
35 (hsCRP), ferritin, tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , interleukin (IL)-6, IL-10, 25-hydroxyvitamin D  
36 [25(OH)D], and homocysteine. Glucose, insulin, total cholesterol (TC), low-density  
37 lipoprotein cholesterol (LDL), high-density lipoprotein cholesterol (HDL) and triglycerides  
38 (TG) were the metabolic biomarkers. Lipidic peroxidation (hydroperoxides) and nitric oxide  
39 metabolites (NOx) were the oxidative and nitrosative stress biomarkers, respectively. For  
40 identification of the rs1130864 *CRP* genotypes, genomic DNA was extracted from the  
41 peripheral blood cells and a 744 base pair sequence of the *CRP* was amplified using the  
42 polymerase chain reaction (PCR). The product obtained by PCR was digested with the  
43 restriction enzyme *HpyCH4III* and analyzed by restriction fragment length polymorphism  
44 (RFLP) method. **Results:** The results were presented and discussed in two original articles.  
45 For the first article, 176 AIS patients and 176 controls were included. All results were  
46 adjusted for possible effects of variables or covariables in multivariate analyzes. General  
47 linear models (GLM) with all IMO&NS with demographic/clinical data showed that the best

1 set of predictors for AIS were sex (male), systolic blood pressure, glucose, NOx,  
2 hydroperoxides, IL-6, leukocytes (all positively associated) and 25(OH)D (negatively  
3 associated) ( $p < 0.001$ ). In the multivariate analysis, sex (men) ( $p < 0.001$ ), hypertension  
4 ( $p < 0.001$ ), smoking ( $p = 0.015$ ) and hsCRP ( $p < 0.001$ ) were estimated as independent  
5 predictors of AIS. With this set of biomarkers, 89.4% of all AIS patients were correctly  
6 classified with sensitivity of 86.2% and specificity of 93.0%. At admission, the values of  
7 ferritin, IL-6, usPCR, peripheral leukocytes, ESR and glucose were higher among those with  
8 high functional disability ( $mRS \geq 3$ ) ( $p < 0.001$ ). In addition, elevated levels of ferritin, IL-6,  
9 usPCR, ESR and glucose and lower levels of 25(OH)D were independently associated with  
10 poor prognosis ( $mRS \geq 3$ ) after three-months follow-up ( $p < 0.001$ ). For the second article, 168  
11 AIS patients and 166 controls were analyzed. The median (interquartile range) of hsCRP was  
12 7.5 (2.6-24.8) mg/L in AIS patients and 1.6 (0.7-3.7) mg/L in controls ( $p < 0.001$ ). The  
13 distribution of the rs1130864 genotypes was in Hardy-Weinberg equilibrium ( $p > 0.05$ ). In the  
14 AIS patients, the frequency of CC, CT and TT genotypes was 95 (56.55%), 60 (35.71%) and 13  
15 (7.74%), respectively. In the control group, the frequency of these genotypes was 91  
16 (54.58%), 63 (37.95%) and 12 (7.23%), respectively. No differences were observed in the  
17 distribution of rs1130864 genotype between patients and controls; in addition, genotypes  
18 were not associated with epidemiological and clinical characteristics, as well as with hsCRP  
19 and other inflammatory biomarkers in AIS patients ( $p > 0.05$ ). On the other hand, controls  
20 carrying the T allele (CT + TT genotypes) presented higher levels of hsCRP ( $p = 0.005$ ) and  
21 higher frequency of hsCRP  $\geq 3$  mg/L than those carrying the CC genotype [odds ratio (OR):  
22 2.031, 95% confidence interval (CI): 1.01-4.10,  $p = 0.045$ ]. In addition, age, mRS values at  
23 baseline and hsCRP contributed positively to the poorer prognosis ( $mRS \geq 3$ ) after three-  
24 months follow-up only in AIS patients carrying the T allele ( $p < 0.001$ ). **Conclusion:** These  
25 results suggest that a set of IMO&NS biomarkers may be useful for predicting the occurrence  
26 of AIS, as well as the early evaluation of short-term outcome. In addition, the rs1130864  
27 variant located in the *CRP* gene, by itself, was not a determinant factor for susceptibility to  
28 AIS; however, in AIS patients carrying the T allele, the levels of hsCRP were independent  
29 predictors for a poor outcome after three months of the ischemic event.

30  
31 **Key words:** Ischemic stroke. Inflammation. Genetic polymorphism. C-reactive protein.  
32 Prognosis.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1		
2		
3	1,25(OH)2D	<i>1,25-dihydroxyvitamin D</i> - 1,25-dihidroxivitamina D
4	25(OH)D	25-hydroxyvitamin D - 25-hidroxivitamina D
5	4-NHE	4-hidroxinonenal
6	AIS	<i>Acute ischemic stroke</i> – Acidente vascular encefálico isquêmico
7	AIT	Acidente isquêmico transitório
8	ATP	Adenosina trifosfato
9	AVE	Acidente vascular encefálico
10	AVEh	Acidente vascular encefálico hemorrágico
11	AVEi	Acidente vascular encefálico isquêmico
12	BBB	<i>Blood Brain Barrier</i> - Barreira hematoencefálica
13	BHE	Barreira hematoencefálica
14	BMI	<i>Body Mass Index</i> - Índice de massa corpórea
15	BDNF	<i>Brain derived neurotrophic factor</i> - Fator neurotrófico derivado do cérebro
16	CEI	<i>Cardioembolic Infarct</i> - Infarto cardioembólico
17	CHD	<i>Cardiac heart disease</i> – Doença cardíaca
18	CI	<i>Confidence interval</i> - Intervalo de confiança
19	CL-LOOH	<i>Lipid hydroperoxide-initiated chemiluminescence</i> - Quimioluminescência
20		induzida por t-Butil Hidroperóxidos
21	CNS	<i>Central nervous system</i> – Sistema nervoso central
22	COX	Cicloxygenase
23	CRP	<i>C-reactive protein</i> – Proteína C reativa
24	CT	<i>Computed Tomography</i> - Tomografia computadorizada
25	CT	Colesterol total
26	CVD	<i>Cardiovascular disease</i> – Doença cardiovascular
27	DBP	<i>Diastolic blood pressure</i> - Pressão sanguínea diastólica
28	DM	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2
29	DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> - Ácido desoxirribonucleico
30	DCV	Doença cardiovascular
31	eNOS	<i>Endothelial nitric oxide synthase</i> - Óxido nítrico sintetase endotelial
32	EPM	Erro padrão da média

1	ERNS	Espécies reativas de nitrogênio
2	EROS	Espécies reativas de oxigênio
3	ESR	<i>Erythrocyte sedimentation rate</i> – Velocidade de hemossedimentação
4	GDNF	<i>Glial cell-line derived neurotrophic factor</i> - Fator neurotrófico derivado da
5		linhagem de células da glia
6	GLM	<i>General linear models</i> – Modelos lineares generalizados
7	GSH	Glutathiona
8	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
9	HBV	<i>Hepatitis B virus</i> - Vírus da hepatite B
10	HCV	<i>Hepatitis C virus</i> - Vírus da hepatite C
11	HDL	<i>High-density lipoprotein</i> - Lipoproteína de alta densidade
12	HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i> - Vírus da imunodeficiência humana
13	HO <sub>2</sub> •	Radical hidroxiperoxila
14	hsCRP	<i>High sensitive C-reactive protein</i> – Proteína C reativa por metodologia
15		ultrassensível
16	IC	Intervalo de confiança
17	IFN	<i>Interferon</i> – Interferon
18	IL	<i>Interleukin</i> - Interleucina
19	IAM	Infarto agudo do miocárdio
20	IMC	Índice de massa corpórea
21	iNOS	<i>Induced nitric oxide synthase</i> - Óxido nítrico sintetase induzida
22	IMO&NS	<i>Inflammatory, metabolic, oxidative and nitrosative stress</i> –
23		Inflamatório, metabólico, estresse oxidativo e nitrosativo
24	JNK	C-jun N-terminal quinase
25	LAAS	<i>Large artery atherosclerosis</i> - Aterosclerose de grandes artérias
26	LAC	<i>Lacunar infarct</i> - Infarto lacunar
27	LCR	Líquido cefalorraquidiano
28	LDL	<i>Low-density lipoprotein</i> – Lipoproteína de baixa densidade
29	Ln	<i>Logarithmic</i> - Logaritmo
30	LPS	Lipopolissacarídeo
31	MAKP	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i> – Proteína quinase ativada por
32		mitógenos

1	MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>	Proteína quimiotática para monócitos 1
2			
3	MDA	<i>Malondialdehyde</i>	Malondialdeído
4	miRNA		Micro RNA
5	MMP	<i>Matrix metalloproteinase</i>	- Metaloproteinases de matriz
6	mRNA	<i>Messenger ribonucleotide acid</i>	- Ácido ribonucleotídeo mensageiro
7	mRS	<i>Modified Rankin Scale</i>	- Escala de Rankin modificada
8	NF-κB	<i>Nuclear factor kappa B</i>	- Fator nuclear <i>kappa B</i>
9	NIHSS	<i>The National Institute of Health Stroke Scale</i>	- Escala de Acidente Vascular
10			Encefálico do Instituto Nacional de Saúde
11	nNOS	<i>Neuronal nitric oxide synthase</i>	- Óxido nítrico sintetase neuronal
12	NO	<i>Nitric oxide</i>	- Óxido nítrico
13	NOS	<i>Nitric oxide synthase</i>	- Óxido nítrico sintetase
14	NOx	<i>Oxide nitric metabolites</i>	- Metabólitos do óxido nítrico
15	O <sub>2</sub> <sup>-</sup>		Ânion superóxido
16	O <sub>2</sub>		Oxigênio
17	ODE	<i>Other determined etiology</i>	- AVEi de outra etiologia determinada
18	OH•		Radical hidroxila
19	ONOO	<i>Peroxynitrite</i>	- Peroxinitrito
20	OR	<i>Odds ratio</i>	- razão de chance
21	PAS		Pressão arterial diastólica
22	PAS		Pressão arterial sistólica
23	PCR		Proteína C-reativa
24	PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>	- Fator de crescimento derivado de plaquetas
25			
26	RBPs	<i>RNA-binding proteins</i>	- Proteínas ligadoras de RNA
27	RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphism</i>	- Polimorfismo de
28			fragmento de restrição
29	RNM		Ressonância nuclear magnética
30	SBP	<i>Systolic blood pressure</i>	- Pressão sanguínea sistólica
31	SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>	- Polimorfismo de um único nucleotídeo
32	SNC		Sistema nervoso central

1	T2DM	<i>Type 2 diabetes mellitus</i> – Diabete <i>mellitus</i> tipo 2
2	TC	Tomografia computadorizada
3	TG	<i>Tryglicerides</i> – Triglicerídeos
4	TGF	<i>Transforming growth factor</i> - Fator de crescimento transformador
5	TIA	<i>Transient ischemic attack</i> – Ataque isquêmico transitório
6	TNF	<i>Tumor necrosis factor</i> - Fator de necrose tumoral
7	TNFR1	Receptor de fator de necrose tumoral 1
8	TNFR2	Receptor de fator de necrose tumoral 2
9	TOAST	<i>Trial of Org in 10172 Acute Stroke Treatment</i>
10	UDE	<i>Undetermined etiology</i> - AVEi com etiologia indeterminada
11	usPCR	Proteína C reativa por metodologia ultrasensível
12	UTR	<i>Untranslated region</i> – Região não transcrita
13	VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i> – Fator de crescimento do endotélio
14		vascular
15	VHS	Velocidade de hemossedimentação
16	WBC	<i>White blood cells</i> – Leucócitos

## SUMÁRIO

1			
2			
3	<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
4	1.1	ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO E INFLAMAÇÃO.....	21
5	1.1.1	Infiltração de Leucócitos .....	23
6	1.1.2	A Regulação da Transcrição de Moléculas Inflamatórias.....	24
7	1.1.3	Proteína C-Reativa (PCR) .....	25
8	1.1.4	Citocinas .....	29
9	1.1.6	Ferro e Ferritina.....	32
10	1.1.7	Vitamina D .....	33
11	1.1.8	Homocisteína.....	34
12	1.2	ESTRESSE OXIDATIVO E ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO .....	35
13	1.3	MARCADORES METABÓLICOS E ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO .....	38
14	1.3.1	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2 (DM) .....	38
15	1.3.2	Dislipidemia .....	40
16	1.4	POLIMORFISMO NO GENE DA PROTEÍNA C-REATIVA .....	42
17			
18	<b>2.</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	51
19			
20	<b>3.</b>	<b>OBJETIVO</b> .....	52
21	3.1	OBJETIVO GERAL .....	52
22	3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	52
23			
24	<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	53
25	4.1	ASPECTOS ÉTICOS .....	53
26	4.2	DELINEAMENTO .....	53
27	4.3	POPULAÇÃO .....	53
28	4.4	CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO .....	53
29	4.5	AMOSTRA .....	54
30	4.6	EXAMES LABORATORIAIS .....	56
31	4.6.1	Marcadores Inflamatórios, metabólicos e de estresse oxidativo .....	56
32	4.7	POLIMORFISMO NO GENE DA PROTEÍNA C-REATIVA (rs1130864).....	57

1	4.7.1	Extração do DNA.....	57
2	4.7.2	Reação em Cadeia da Polimerase para o Polimorfismo rs1130864 .....	58
3	4.7.3	Polimorfismos no comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP) para o	
4		polimorfismo rs1130864 .....	60
5	4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	63
6			
7	<b>5.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>65</b>
8			
9	<b>7.</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>118</b>
10			
11	<b>8.</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>119</b>
12			
13		<b>ANEXOS .....</b>	<b>135</b>
14			
15		<b>APÊNDICE .....</b>	<b>136</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O acidente vascular encefálico (AVE) caracteriza-se por um déficit neurológico, geralmente focal, de instalação súbita e rápida evolução, decorrente do dano localizado em alguma região cerebral, o qual pode ser de natureza isquêmica (AVEi) ou hemorrágica (AVEh). É a segunda maior causa de mortalidade e morbidade, principalmente na população acima dos 55 anos de idade, causando forte impacto econômico e social (BENJAMIN et al., 2018). No caso do AVEi, o dano no tecido cerebral é causado pela redução da oferta tissular de oxigênio (O<sub>2</sub>) e do suprimento energético decorrentes do comprometimento do fluxo sanguíneo (isquemia) para aquela respectiva região. A evidência de lesão cerebral, independente da duração e persistência dos sintomas neurológicos, suporta o diagnóstico de AVEi. Quando o fenômeno isquêmico cerebral tivesse duração de menos de 24 horas, denominava-se de ataque isquêmico transitório (AIT), segundo a definição originalmente proposta baseada no tempo (HARRISON; MARSHAL; THOMAS, 1978). Posteriormente, a definição de AIT foi baseada no tecido, ou seja, na ausência de dano no tecido cerebral. Portanto, AIT é diagnosticada somente quando ocorre ausência de lesão cerebral, revelada por exames de neuroimagem, e com a reversibilidade dos sintomas (ALBERS et al., 2002; CAROLEI et al., 2013).

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). Um estudo realizado na população brasileira registrou uma taxa de incidência de 105,4/100.000 indivíduos e mortalidade de

1 23,9/100.000 (CABRAL et al., 2009) e Bensenor e colaboradores (2015) demonstraram que  
2 25% dos casos de AVEi permanecem com grave incapacidade.

3 Em 2013, segundo dados do Ministério da Saúde, o Brasil registrou 26.436  
4 internações referentes ao AIT e 130.278 internações referentes ao AVE não especificado  
5 em isquêmico ou hemorrágico (BRASIL, 2013). Todavia, a incidência de AVE no Brasil  
6 permanece especulativas. Uma possibilidade é que a prevalência de AVE seja maior no  
7 Brasil do que em outros países. Os dados obtidos por alguns estudos de prevalência  
8 realizados no Brasil não são suficientes para fornecer uma visão geral da prevalência, uma  
9 vez que a maioria desses estudos foi realizada em regiões específicas que não refletem  
10 necessariamente toda a realidade do país (COPSTEIN; FERNANDES; BASTOS, 2013). Outras  
11 possíveis explicações dependem de deficiências na assistência médica, principalmente  
12 impulsionadas pela desigualdade socioeconômica. De fato, estudos prévios mostraram que  
13 a maioria dos pacientes é assistida em hospitais públicos, onde os recursos diagnósticos e  
14 terapêuticos são escassos (ABE et al., 2011; ROLIM; MARTINS, 2011; FERNANDES et al.,  
15 2012; KUSTER et al., 2014; LOPES et al., 2016). No entanto, o impacto negativo dessas  
16 discrepâncias no desfecho do AVE no Brasil ainda requer confirmação por grandes estudos  
17 populacionais.

18 Os fatores de risco para a ocorrência do AVEi são classificados como não  
19 modificáveis e incluem idade, sexo, etnia e variantes genéticas, e modificáveis que incluem  
20 hipertensão, dislipidemia, diabete *mellitus* tipo 2 (DM), obesidade, sedentarismo,  
21 tabagismo, etilismo, hipovitaminose D, fibrilação atrial, uso de contraceptivo oral, terapia  
22 hormonal pós-menopausa, estenose carotídea, AVE e AIT prévios (GO et al., 2014;  
23 BENJAMIN et al., 2018).

24 Cerca de 85,0% dos AVE são de origem isquêmica (AVEi) e 15% são AVEh;  
25 destes, 10,0% decorrentes de hemorragia intracerebral espontânea e 5,0% de hemorragia  
26 subaracnóidea (GO et al., 2014). Segundo os critérios definidos pelo *Trial of Org 10172 in*  
27 *Acute Stroke Treatment* (TOAST), o AVEi é classificado em 5 categorias dependendo dos  
28 dados clínicos, dos exames laboratoriais e de imagem (ADAMS et al., 1993), sendo as os  
29 subtipos mais importantes os de doença aterosclerótica de grandes artérias (LAAS), infarto  
30 lacunar (LAC) e infarto cardioembólico (CEI). Além desses, existem inúmeras outras causas,  
31 como vasculites, trombofilias, anemia falciforme, dissecação arterial e doenças genéticas,  
32 caracterizando como AVEi de outra etiologia determinada (ODE). Em até 30,0% dos casos, a

1 etiologia não pode ser definida, caracterizando o AVEi de etiologia indeterminada (UDE).  
2 Quanto ao AVEh, as principais causas relacionadas às hemorragias intracerebrais  
3 espontânea e subaracnóidea são, respectivamente, a hipertensão arterial sistêmica e os  
4 aneurismas e malformações arteriovenosas cerebrais (ROSAMOND et al., 2008).

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

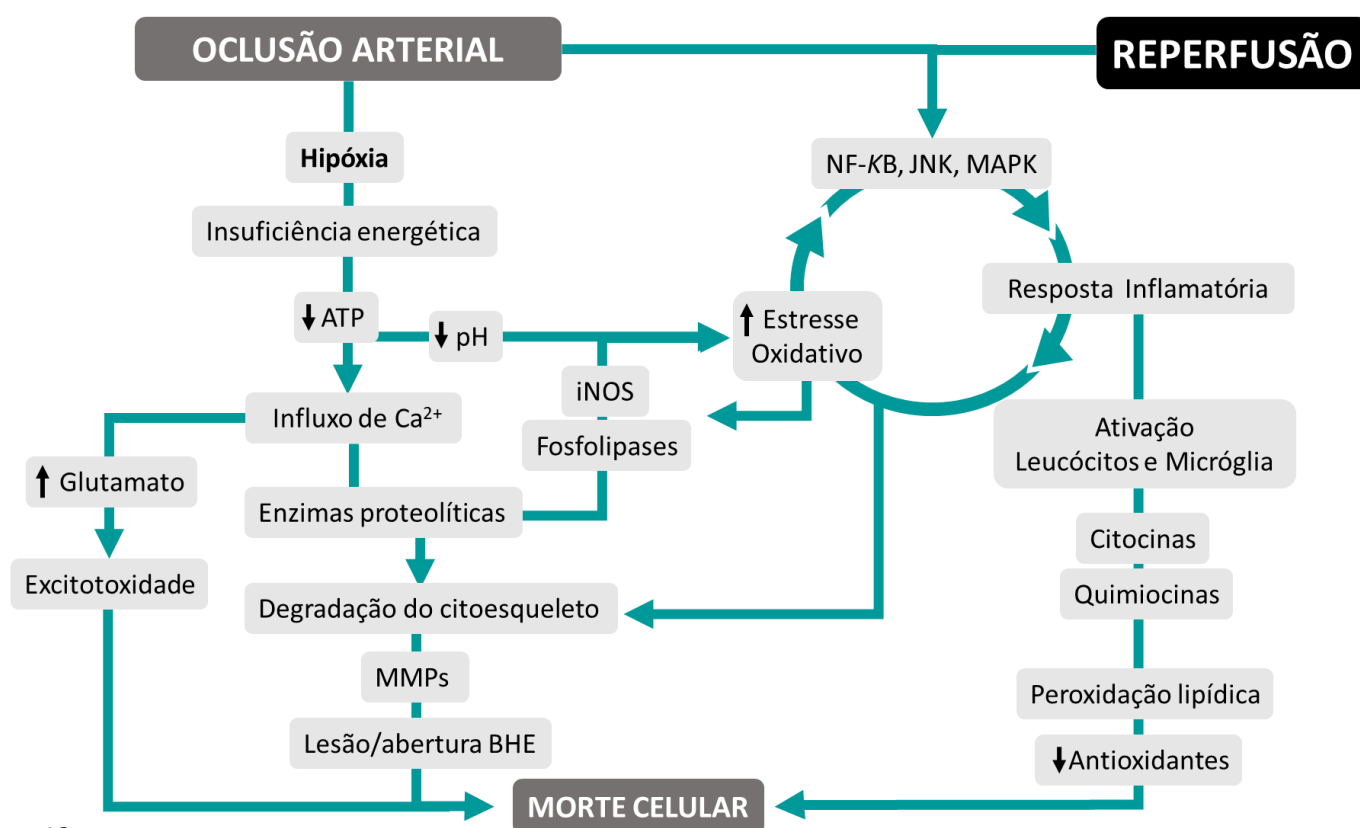
17 As alterações celulares e moleculares presentes na cascata isquêmica após o  
18 AVEi agudo estão representadas na Figura 1 e podem ser explicadas em três fases. A  
19 primeira corresponde à fase aguda e ocorre dentro de minutos à algumas horas após o  
20 início da isquemia, em que a diminuição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

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

8

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

11



12

13

14 ATP: Adenosina trifosfato; iNOS: Óxido nítrico sintetase induzida; NF-κB: Fator nuclear *kappa* B; JNK: C-jun N-  
 15 terminal quinase; MAPK: Proteína quinase ativada por mitógenos; MMPs: Metaloproteinases de matriz; BHE:  
 16 Barreira hematoencefálica

17 Fonte: Próprio autor

18

1 O AVEi é difícil de prever pois muitas pessoas com fatores de risco tradicionais  
2 como hipertensão, DM e hiperlipidemia não apresentam AVEi, e outros que têm um estilo  
3 de vida saudável podem ter o evento cerebral isquêmico no início da vida sem uma  
4 explicação razoável. Além disto, o diagnóstico rápido de AVEi continua a ser um desafio em  
5 muitas situações, quando a apresentação clínica é vaga e exames de neuroimagem, como a  
6 tomografia computadorizada (TC) de crânio e a ressonância nuclear magnética (RNM), não  
7 estão prontamente disponíveis em muitos serviços de saúde.

8 Somando-se a estas dificuldades, até 30% dos AVEi são criptogênicos, ou seja,  
9 sem etiologia determinada. Portanto, a identificação de um biomarcador ou um painel de  
10 biomarcadores associados ao AVEi é altamente desejável, pois pode melhorar o  
11 diagnóstico de uma doença com elevada morbidade e mortalidade. Para servir como  
12 biomarcador, essas associações devem ser confiáveis, terem sensibilidade e especificidade  
13 adequadas e boa explicação fisiopatológica. Embora nenhum metabólito ou combinação de  
14 metabólitos descobertos ainda se encaixe nesses critérios, durante os últimos 10 anos,  
15 foram observadas associações entre algumas alterações inflamatórias e metabólicas com  
16 isquemia cerebral que permitiram a identificação de três categorias fisiopatológicas  
17 principais associadas ao AVEi: 1) excitotoxicidade ou neurotoxicidade (LAI; ZHANG; WANG,  
18 2014), estresse oxidativo (FUKUYAMA et al., 1998) e inflamação (CHAMORRO et al., 2012,  
19 2016).

20 Uma das tecnologias que auxiliam a compreensão o processo bioquímico no  
21 cérebro após o AVEi é a metabolômica. Esta pode ser realizada em diferentes tecidos  
22 corporais ou fluidos e identificar metabólitos com valores significativamente aumentados  
23 ou diminuídos secundários a processos fisiopatológicos. A maioria dos estudos de AVEi que  
24 empregam a metabolômica foi realizada na Ásia e teve delineamentos exploratórios e,  
25 embora não tenha encontrado biomarcadores específicos, os resultados demonstraram  
26 várias associações importantes de AVEi com metabólitos que pertencem a três  
27 mecanismos fisiopatológicos: 1) inflamação mediada por AVEi afetando o metabolismo dos  
28 fosfolipídios com níveis alterados de lisofosfatidiletanolamina e lisofosfatidilcolina; 2)  
29 estresse oxidativo com produção de radicais livres e concentrações alteradas de ácido  
30 úrico, metaloproteinases de matriz (MMP)-9, aminoácidos de cadeia ramificada,  
31 esfingolipídios, homocisteína, dimetilarginina assimétrica, óxido nítrico (NO) e metabólitos  
32 do ciclo do folato; e 3) excitotoxicidade com ativação de glutamato, resultando no

1 aumento dos derivados de glutamato, prolina e piroglutamato (SIDOROV; SANGHERA;  
2 VANAMALA, 2019).

3 No entanto, com poucas exceções, os resultados desses estudos são  
4 inconsistentes ou não reprodutíveis e precisam de avaliação adicional em estudos  
5 prospectivos com pacientes pareados por idade, fatores de risco e medicamentos  
6 (SIDOROV; SANGHERA; VANAMALA, 2019).

7

## 8 1.1 ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO E INFLAMAÇÃO

9

10 Na isquemia cerebral, a resposta inflamatória desempenha um papel na  
11 depuração de detritos celulares; no entanto, também aumenta o dano ao tecido. A  
12 resposta imune no local da lesão é caracterizada pela infiltração, acúmulo e ativação de  
13 células inflamatórias. Em poucas horas após o início da isquemia cerebral, leucócitos  
14 periféricos aderem ao endotélio cerebral, atravessam a parede do vaso e invadem o  
15 parênquima danificado (PETTY; WETTSTEIN, 2001; CHAMORRO et al., 2012; KAWABORI;  
16 YENARI, 2015). Ao mesmo tempo, astrócitos e a micróglia são ativados. Estes eventos  
17 celulares dependem da secreção de mediadores inflamatórios que são produzidos por  
18 células neuronais e gliais em resposta a um insulto isquêmico. Uma vez ativadas no local da  
19 lesão, células inflamatórias começam a produzir uma grande variedade de agentes  
20 citotóxicos, tais como citocinas e quimiocinas e promovem o aumento da expressão de  
21 moléculas de adesão, MMPs e a ruptura da barreira hematoencefálica (BHE) (KAWABORI;  
22 YENARI, 2015).

23 Micróglia são macrófagos residentes do cérebro, sendo sensíveis às alterações  
24 no seu microambiente neuronal e, em resposta a uma lesão, rapidamente se tornam  
25 ativados e sofrem transformações morfológicas, bem como alterações funcionais (LADEBY  
26 et al., 2005; RAIVICH et al., 1999; STREIT; WALTER; PENNELL, 1999). Com a morte dos  
27 neurônios, estes macrófagos cerebrais são estimulados e proliferam rapidamente para  
28 sítios focais de lesões devido a um aumento da expressão de moléculas da superfície das  
29 células imunorreativas e pela produção de várias moléculas inflamatórias, tais como  
30 fatores quimiotáticos que induzem o recrutamento de outras células microgliais. Em  
31 modelo experimental de isquemia cerebral, o acúmulo da micróglia ativada é  
32 acompanhado por um aumento da expressão de interleucina (IL)-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-10, das

1 citocinas fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$  e interferon (IFN)- $\gamma$  e das quimiocinas (GARDEN;  
2 MÖLLER, 2006).

3 Os astrócitos modulam as funções fagocíticas da micróglia e promovem a  
4 expressão de moléculas de adesão na unidade neurovascular em células endoteliais e  
5 leucócitos circulantes (BEZZI et al., 2001; KIMELBERG, 2005). Estes processos inflamatórios  
6 iniciais são prejudiciais para a sobrevivência dos neurônios.

7 A função das células micróglia e macrófagos varia de acordo com seus  
8 diferentes estados de polarização, podendo exercer um papel lesivo na fase aguda do AVEi  
9 ou protetor em processos envolvidos na recuperação neurológica em várias doenças do  
10 sistema nervoso central (SNC), incluindo neurogênese, sinaptogênese, angiogênese,  
11 oligodendrogênese e remielinização. Sob condições fisiopatológicas, como após o AVEi,  
12 ocorre a polarização fenotípica da micróglia e monócitos/macrófagos em clássicos (pró-  
13 inflamatórios; tipo M1) ou alternativos (anti-inflamatórios ou protetores; tipo M2). Mais  
14 precisamente, a microglia tipo M1 secreta citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ,  
15 IL-12, IL-23, além do óxido nítrico (NO), e exacerba a inflamação e a lesão tecidual. Em  
16 contraste, a microglia tipo M2 secreta citocinas anti-inflamatórias, como fator  
17 transformador do crescimento (TGF)- $\beta$ , IL-4, IL-10, IL-13, e fatores de crescimento como o  
18 fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator neurotrófico derivado do cérebro  
19 (BDNF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e progranulina, com o objetivo  
20 de suprimir a inflamação e promover a recuperação tecidual.

21 Importante para a regulação da resposta imune, a resposta inicial tipo M1 é  
22 tipicamente seguida por uma ativação secundária tipo M2 que é importante para a  
23 neuroregeneração e supressão da inflamação. A resposta tipo M1 exibe um aumento nos  
24 primeiros 14 dias. Já a resposta tipo M2 exibe um aumento transitório nos primeiros 1 e 2  
25 dias. Subsequentemente, a resposta tipo M2 tende a decrescer. Entretanto, não se sabe se  
26 a resposta tipo M2 aumenta após os primeiros 14 dias. Evidências apontam que, após o  
27 AVEi, ocorre uma troca de fenótipo M2 para M1 nos 2 a 3 primeiros dias e que a maioria  
28 das citocinas retorna aos valores basais no 14º dia (KANAZAWA et al., 2017).

29 Embora micróglia e macrófagos tipo M1 e tipo M2 expressem receptores  
30 fagocíticos, micróglia e macrófagos tipo M2 podem apresentar uma capacidade fagocitária  
31 maior para remover neurônios mortos do que o fenótipo tipo M1 (MCWHORTER et al.,  
32 2013). Por outro lado, os fenótipos tipo M1 podem causar perda neuronal aumentando a

1 fagocitose de neurônios viáveis, por produzir altos níveis de EROS (BROWN; NEHER, 2014).  
2 Em contraste, os fenótipos do tipo M2 desencadeiam respostas antioxidantes após o AVEi,  
3 suprimindo os níveis de EROs. Além disso, os fenótipos do tipo M2 induzem respostas  
4 antioxidantes aumentando os níveis de glutathiona-SH (GSH) e heme oxigenase-1  
5 (FAUSTINO et al., 2011). Assim, a fagocitose mediada por micróglia do tipo M2 e  
6 monócitos/macrófagos pode ser neuroprotectora, enquanto que a mediada por micróglia  
7 do tipo M1 e monócitos/macrófagos pode resultar em danos neuronais.

8

### 9 1.1.1. Infiltração de Leucócitos

10

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

17 Os leucócitos infiltrados promovem lesão isquêmica cerebral de maneiras  
18 diferentes. Primeiro, a adesão de leucócitos ao endotélio pode reduzir o fluxo de eritrócitos  
19 através da microvasculatura, causando o fenômeno de *no-reflow* cerebral e lesão cerebral  
20 adicional. Leucócitos ativados na superfície do endotélio também liberam proteases, EROS  
21 e ERNS, gelatinases e colagenases, e prejudicam vasos sanguíneos e tecidos cerebrais  
22 potencialmente aproveitáveis. A ativação da fosfolipase nos leucócitos leva à produção de  
23 substâncias biologicamente ativas, como leucotrienos, eicosanóides, prostaglandinas e  
24 fator ativador de plaquetas, que resultam em vasoconstrição e prolongam a agregação  
25 plaquetária. Por fim, os leucócitos infiltrados liberam citocinas pró-inflamatórias e outras  
26 moduladoras na penumbra ao redor do núcleo do infarto, causando mais danos neuronais  
27 (KIM et al., 2016).

28 Outro fator importante, os leucócitos contribuem para o aumento da expressão de  
29 MMPs, tais como a MMP-9 que está envolvida na degradação dos componentes da matriz  
30 extracelular e da lâmina basal e que pode potencializar complicações hemorrágicas após o  
31 AVEi (ROSELL et al., 2008).

1 Leucócitos ativados, especialmente neutrófilos, causam danos nas lesões  
2 isquêmicas reperfundidas. De fato, a contagem de neutrófilos foi considerada um preditor  
3 independente de AVEi recorrente (ERNST et al., 1987; GRAU et al., 2004). Outro estudo  
4 demonstrou que a contagem de leucócitos totais e de neutrófilos puderam prever a  
5 ocorrência de futuros eventos isquêmicos (WU et al., 2013; GARCIA-BONILLA et al., 2014;  
6 KIM et al., 2016). Os neutrófilos exercem um papel no desenvolvimento e instabilidade da  
7 placa aterosclerótica e liberam substâncias que induzem vasoconstrição e agregação  
8 plaquetária (CARBONE; MACH; MONTECUCCO, 2015).

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

#### 16 17 1.1.2. A Regulação da Transcrição de Moléculas Inflamatórias

18  
19 As alterações celulares e moleculares que ocorrem com a isquemia cerebral  
20 desencadeiam a ativação de vários fatores de transcrição envolvidos na resposta  
21 inflamatória. O fator nuclear *kappa* B (NF- $\kappa$ B), quando ativado, induz a expressão de genes  
22 que codificam as moléculas de adesão celular, receptores de superfície celular e citocinas  
23 (BAEUERLE; HENKEL, 1994; STEPHENSON et al., 2000). Proteína quinase ativada por  
24 mitógeno (MAPK) é uma das vias de sinalização que regula positivamente a transcrição de  
25 genes inflamatórios, tais como os que codificam o TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e a ciclooxigenase  
26 (COX)-2 (COULTHARD et al., 2009). A ativação de C-jun N-terminal quinase (JNK) pode  
27 potencializar ainda mais a lesão do tecido cerebral e culminar com apoptose e necrose do  
28 tecido dentro de horas e dias (DEL ZOPPO et al., 2000; FEUERSTEIN; WANG; BARONE, ;  
29 ISHIKAWA et al., 2004).

30

31

### 1 1.1.3. Proteína C-Reativa (PCR)

2

3 A PCR é uma proteína de fase aguda positiva, com marcada elevação da  
4 concentração em resposta a diversos estímulos inflamatórios. Na presença de  $Ca^{2+}$ , tem a  
5 capacidade de se ligar a fosfocolina expressa na superfície de células mortas ou lesadas, e  
6 de algumas bactérias, formar complexos e ativar a via clássica do sistema complemento,  
7 com consequente opsonização desses substratos para posterior fagocitose pelos  
8 macrófagos (MOLD; GEWURZ; DU CLOS, 1999). O principal órgão que sintetiza a PCR é o  
9 fígado, produzida em resposta ao estímulo de citocinas pro inflamatórias, como a IL-6 e IL-  
10 1 $\beta$ . A IL-6 é reconhecida como sendo a maior reguladora da PCR sanguínea (WEINHOLD;  
11 RÜTHER, 1997).

12 A produção da PCR ocorre em resposta à inflamação, infecção e trauma  
13 (EKLUND; LEHTIMÄKI; HURME, 2005). Níveis séricos de PCR maiores que 10 mg/L são,  
14 geralmente, considerados indicativos de um processo infeccioso ou inflamatório agudo  
15 (PEPYS; HIRSCHFIELD, 2003). A elevação da PCR sanguínea após injúria tecidual é rápida e  
16 robusta, com níveis aumentando até mais de 1000 vezes acima do valor basal dentro de 24  
17 horas (GABAY; KUSHNER, 1999), o que faz da PCR um bom marcador para o diagnóstico e  
18 monitoramento de processos inflamatórios.

19 A PCR participa ativamente do desenvolvimento das doenças cardiovasculares  
20 (DCV) por influenciar diretamente nos processos como ativação do sistema complemento,  
21 apoptose, ativação de células vasculares, recrutamento de monócitos, acúmulo de lipídios  
22 e trombose. A PCR pode gerar respostas inflamatórias que se ligam à fosfatidilcolina no  
23 exterior da lipoproteína de baixa densidade (LDL)-oxidada e na superfície das células  
24 apoptóticas e agregação plaquetária; desta maneira, contribui para complicações  
25 aterotrombóticas promovendo a trombose (VERMA; SZMITKO; RIDKER, 2005) (Figura 2).

26 Muitos biomarcadores inflamatórios têm sido relatados como úteis no  
27 diagnóstico e prognóstico do AVEi, e a PCR continua sendo um dos mais amplamente  
28 utilizados na prática clínica (VILA et al., 2000; EVERETT et al., 2006; YU et al., 2017). Os  
29 níveis séricos de PCR têm sido considerados indicadores sensíveis de eventos  
30 cerebrovasculares iniciais e recorrentes (ARENILLAS et al., 2003; DI NAPOLI et al., 2005).  
31 Além disso, estudos sugerem uma associação entre determinados polimorfismos do gene

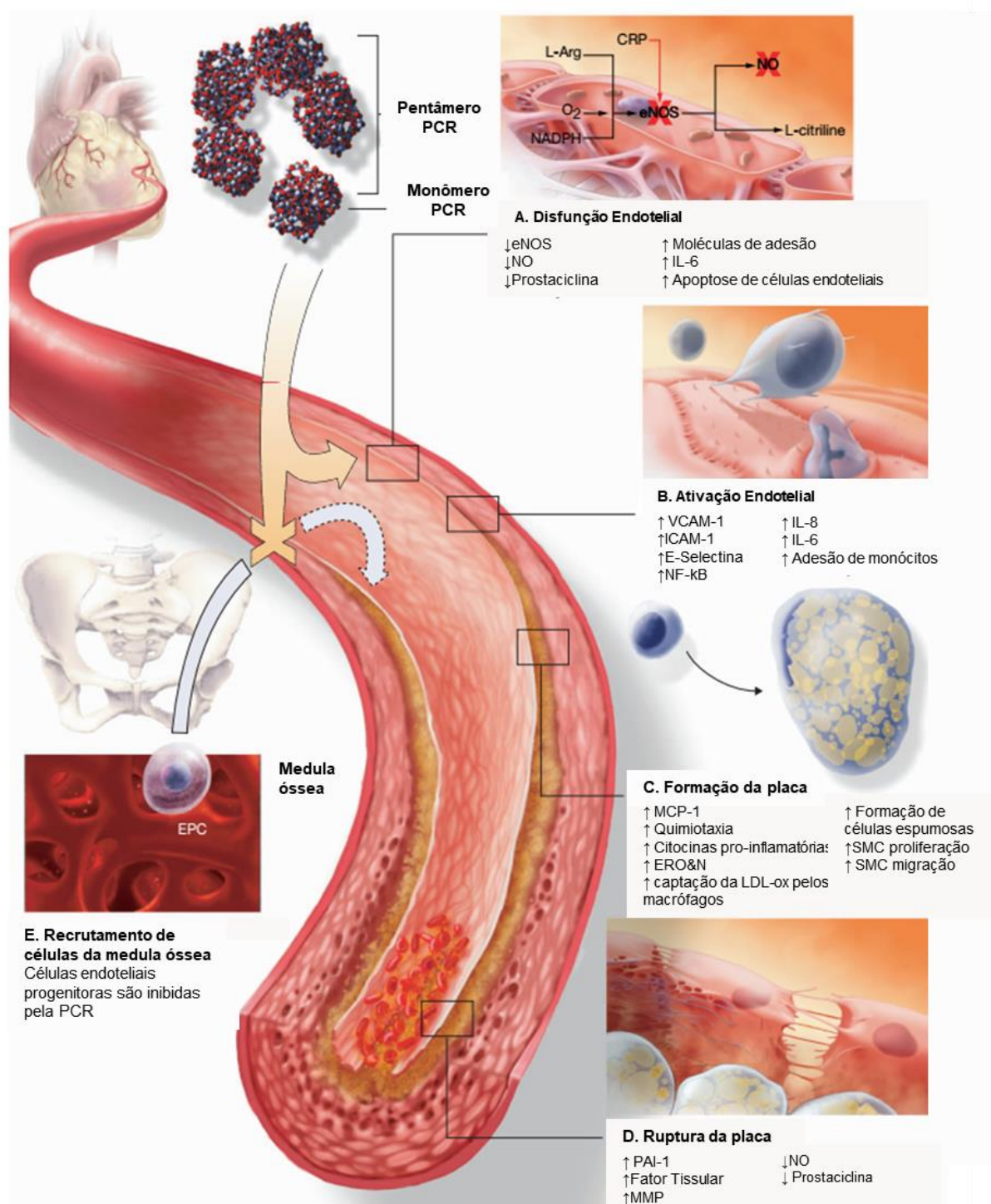
1 da PCR, em que há maior produção de PCR, e risco para AVEi (MORITA; NAKAYAMA; SOMA,  
2 2006).

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

14

15

1 **Figura 2** Principais participações da Proteína C Reativa nas doenças cardiovasculares



2

3 PCR: Proteína C-Reativa; eNOS: Óxido nítrico sintetase endotelial; NO: Óxido nítrico; IL: Interleucina; VCAM-  
 4 1: Molécula de adesão celular vascular 1; ICAM-1: Molécula de adesão intercelular 1; NK-kB: Fator nuclear  
 5 *kappa* B; MCP-1: proteína quimiotática para monócitos 1; ERO&N: espécies reativas de oxigênio e nitrogênio;  
 6 LDL-0x: lipoproteína de baixa densidade oxidada; SMC: célula muscular lisa; PAI-1: Inibidor do ativador de  
 7 plasminogênio tipo 1; MMP: metaloproteinases de matriz; EPC: célula progenitora endotelial.

8 FONTE: Adaptado de Verma; Szmítzko; Ridker (2005).

1 Bielewicz e colaboradores (2015) analisaram os níveis de PCR e S100BB no 1º,  
2 3º, 5º e 10º dia após o AVEi. A S100BB é uma proteína derivada das células da glia e pode  
3 ser detectada no sangue como um resultado da destruição destas células e também pode  
4 ser considerada como um indicador de disfunção da BHE durante o evento isquêmico.  
5 Estes autores observaram que os níveis de PCR se correlacionam diretamente com a piora  
6 clínica, volume da lesão isquêmica e os níveis da proteína S100BB. No grupo de pacientes  
7 com baixos níveis séricos PCR (0,51-24,68 mg/mL), os níveis de S100BB e o volume da área  
8 isquêmica foram menores do que no grupo com níveis elevados de PCR (24,69-209  
9 mg/mL).

10 Níveis elevados de PCR foram associados com pior evolução após o AVEi e AVEh  
11 (CASTILLO et al., 2002; EVERETT et al., 2006). Uma coorte de 15.632 mulheres, inicialmente  
12 saudáveis, foi monitorada clínica e laboratorialmente por um período de 10 anos e os  
13 resultados demonstraram um risco relativo de 2,76, com intervalo de confiança (IC) de  
14 95%: 1,51-5,05 para um futuro AVEi, e sugerem a usPCR como um potente marcador de um  
15 futuro AVEi quando comparada aos níveis de lipídeos, isoladamente (EVERETT et al., 2006).  
16 Zhou e colaboradores (2015), em uma metanálise, demonstraram que indivíduos que  
17 apresentaram altos níveis de usPCR tinham 46,0% mais chance de AVEi; no entanto, não  
18 observaram efeito deste marcador sobre a previsão de risco de AVEh (ZHOU et al., 2015).

19 Além disso, níveis mais elevados de PCR foram associados ao volume do infarto  
20 (SMITH et al., 2004) e com pior prognóstico após ajuste para idade, sexo,  
21 comprometimento funcional avaliado pela *National Institute of Health Stroke Scale* (NIHSS),  
22 subtipos de AVEi e fatores de risco convencionais (MATSUO et al., 2016).

23 A dosagem de PCR após o evento isquêmico, tem sido associada a outros  
24 desfechos clínicos. Um estudo demonstrou o valor prognóstico dos biomarcadores usPCR e  
25 procalcitonina, mensurados dentro de 24 horas após AVEi, como preditores independentes  
26 da mortalidade após um ano em pacientes admitidos com AVEi (LI; LIU, 2015). Zhang e  
27 colaboradores (2017) verificaram que os níveis séricos de usPCR, obtidos prospectivamente  
28 em pacientes até 24 horas após o AVEi, foram preditores da recorrência do evento  
29 isquêmico nestes pacientes. Bustamante e colaboradores (2017) realizaram uma revisão  
30 sistemática e demonstraram que a PCR foi independentemente associada com o  
31 desenvolvimento de infecção após o AVEi, com o tempo ideal para sua mensuração entre  
32 24-48 horas. Entretanto, seu valor preditivo adicional é moderado quando comparado à

1 informação clínica e, diante deste resultado, os autores salientam que a combinação da  
2 PCR com um painel de outros biomarcadores parece ser uma estratégia mais promissora  
3 em estudos futuros (BUSTAMANTE et al., 2017).

4 Na presença de vários fatores de risco modificáveis tais como hipertensão, DM,  
5 obesidade e tabagismo, é possível que os pacientes vítimas de AVEi apresentem um estado  
6 inflamatório e pró-coagulante preexistente, o que pode, pelo menos em parte, contribuir  
7 para alteração das provas inflamatórias rotineiramente realizadas na avaliação laboratorial  
8 destes pacientes após o evento isquêmico. Entre elas, o aumento da contagem de  
9 leucócitos periféricos, com neutrofilia, aumento dos níveis de proteínas de fase aguda,  
10 como PCR, proteínas do sistema complemento, ferritina, fibrinogênio, entre outras. Em  
11 especial o aumento do fibrinogênio contribui para o aumento da velocidade de  
12 hemossedimentação (VHS) após o AVEi (SINGH et al., 2014). A elevação dos valores de VHS  
13 é observada nas primeiras 24 horas após o AVEi e pode refletir a relação entre o grau de  
14 resposta de fase aguda na fase precoce do AVEi e a extensão do dano cerebral local. No  
15 entanto, a VHS é um marcador inespecífico de inflamação e deve ser analisado em  
16 conjunto com outros achados clínicos e laboratoriais nestes pacientes (ZAREMBA;  
17 SKROBAŃSKI; LOSY, 2004).

18

#### 19 1.1.4. Citocinas

20

21 As citocinas estão aumentadas em resposta a vários estímulos inflamatórios,  
22 entre eles a isquemia que ocorre no AVEi, e são expressas tanto pelas células do sistema  
23 imune, como também pelas células residentes do cérebro (LIU et al., 1994). As citocinas da  
24 imunidade inata, tais como a IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  são as que iniciam esta resposta inflamatória.  
25 Esta ativação é muito precoce, porém transitória. As citocinas têm importante papel no  
26 desenvolvimento da reação da fase aguda, tais como febre, leucocitose, elevação das  
27 proteínas de fase aguda positivas e na expressão das moléculas de adesão, as quais  
28 contribuem para a agregação de leucócitos e posterior adesão na parede vascular  
29 (HALLENBECK, 1996; DEGRABA, 1998). As citocinas IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 e TGF- $\beta$  são as  
30 mais investigadas relacionadas ao AVEi (KHOSHNAM et al., 2017).

31 A micróglia ativada contribui com a maior parte da produção inicial de IL-1 $\beta$ ,  
32 seguida por astrócitos, neurônios e células endoteliais (ROTHWELL; LUHESHI, 2000). O

1 aumento do ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) de IL-1 $\beta$  foi observado entre 15-30  
2 minutos após isquemia (DAVIES et al., 1999) e a expressão tardia é devida a um influxo de  
3 células inflamatórias no SNC (LEGOS et al., 2000; ROTHWELL; LUHESHI, 2000). A IL-1 $\beta$   
4 promove proliferação e ativação de astrócitos que levam à astrogliose, exacerbação de  
5 perda neuronal e a maior gravidade do AVEi (DAVIES et al., 1999; SIMI et al., 2007). No  
6 SNC, IL-1 $\beta$  estimula a sua própria produção e a expressão de outros mediadores pró  
7 inflamatórios.

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

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

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

1           A IL-6 é uma citocina pró-inflamatória com diversas funções biológicas e efeitos  
2 deletérios que podem contribuir para a lesão inflamatória inicial no cérebro. A IL-6 é  
3 detectada 4 horas após o início do AVEi, com concentrações de pico depois de um dia e  
4 permanece detectável por até 14 dias (NILUPUL PERERA et al., 2006). A micróglia ativada,  
5 juntamente com astrócitos, neurônios e leucócitos compreendem as principais fontes de  
6 IL-6 (LEGOS et al., 2000). Tal como a IL-1 $\beta$ , IL-6 é um pirógeno endógeno, atrai os linfócitos  
7 para o cérebro e contribui para exacerbação da resposta inflamatória (SHAAFI et al., 2014),  
8 e estudos relataram aumento nas concentrações de IL-6 nos tecidos cerebrais após o AVEi  
9 (DING et al., 2011; WRIGHTING; ANDREWS, 2006).

10           A IL-6 está envolvida na regulação da apoptose de neurônios e sua regulação é  
11 aumentada após a isquemia cerebral (HERRMANN et al., 2003). Estudos clínicos em  
12 pacientes com AVEi mostraram que a concentração sérica de IL-6 representa valor  
13 preditivo independente para mortalidade hospitalar (RALLIDIS et al., 2006). Além disso, o  
14 aumento dos seus níveis plasmáticos apresentou forte correlação com a intensidade da  
15 resposta de fase aguda, considerado um potente preditor para deterioração neuronal  
16 precoce (VILA et al., 2000). O aumento da IL-6 tem sido associado com maior volume da  
17 área infartada (CASTILLO et al., 2002) e com pior prognóstico do paciente (SMITH et al.,  
18 2004).

19           Na modulação da resposta inflamatória, citocinas como o TGF- $\beta$  e IL-10 têm sido  
20 avaliadas no AVEi. Embora o TGF- $\beta$  funcione, simultaneamente, em várias vias  
21 inflamatórias para proteger o cérebro, a concentração endógena é insuficiente para inibir  
22 danos graves após o AVEi (DHANDAPANI; BRANN, 2003). Quanto à IL-10, esta citocina anti-  
23 inflamatória é expressa após o início do AVEi com pico em 3 dias. Animais *knockout* para o  
24 gene *IL10* apresentam exacerbação da resposta inflamatória frente à isquemia cerebral e  
25 maior área de lesão (PÉREZ-DE PUIG et al., 2013); demonstrou-se, também, que a  
26 administração desta citocina pode reduzir os danos após isquemia cerebral experimental  
27 (SPERA et al., 1998). O aumento da expressão da IL-10 foi associado ao melhor prognóstico  
28 e parece estar relacionado aos fatores de recuperação cerebral pós-AVEi (VAN EXEL et al.,  
29 2002; PROTTI et al., 2013) . No entanto, Chang e colaboradores (2010) demonstraram que  
30 altos níveis de IL-10 foram forte e independentemente correlacionados com o  
31 comprometimento neurológico grave após 48 horas, quando avaliado pelo NIHSS, assim  
32 como após 90 dias do evento isquêmico. Garcia e colaboradores (2017) relataram que o

1 papel da IL-10 no microambiente cerebral proinflamatório ainda não está totalmente  
2 elucidado e pode ser temporalmente diferente dependendo da etiologia da lesão cerebral.  
3 Segundo os autores, níveis elevados de IL-10 podem predizer pior prognóstico após AVEh,  
4 ao passo que podem predizer melhor prognóstico após o AVEi.

5

#### 6 1.1.6. Ferro e Ferritina

7

8 O ferro é o metal essencial mais importante que medeia a geração de radicais  
9 livres por meio da reação Fenton. Além disso, a hipóxia e o ferro livre parecem interagir  
10 uns com os outros, causando a morte neuronal subsequente (SOROND; RATAN, 2000).

11 Foi relatado que a IL-6 leva a um aumento na produção de hepcidina e  
12 diminuição no ferro sérico dentro de poucas horas após o início da inflamação (NEMETH et  
13 al., 2004; DARSHAN; ANDERSON, 2009). Estudos revelaram que a IL-6 pode ativar a via de  
14 sinalização JAK/STAT regulando assim positivamente o nível de p-STAT3. O p-STAT3 liga-se  
15 ao promotor HAMP e aumenta assim a expressão da hepcidina (NEMETH et al., 2004).  
16 Além disso, o NO tem um impacto no metabolismo do ferro celular, podendo afetar o  
17 armazenamento, o transporte, a utilização do ferro e a regulação da ferritina (DRAPIER et  
18 al., 1993; WATTS; PONKA; RICHARDSON, 2003).

19 Castellanos e colaboradores (2002) demonstraram que o aumento do consumo  
20 de ferro estava associado ao aumento da extensão do infarto após a obstrução da artéria  
21 cerebral média de ratos. E o tratamento com quelante de ferro apresentou menores  
22 complicações após o evento isquêmico (DAVIS et al., 1997).

23 Previamente, nosso grupo de pesquisa demonstrou que a ferritina foi um  
24 marcador associado ao evento isquêmico (LEHMANN et al., 2015). Chakraborty e  
25 colaboradores (2013) mostraram que os níveis séricos de ferritina foram significativamente  
26 maiores do que os controles no dia da internação, e a diferença persistiu mesmo após 6  
27 meses do AVEi, com apenas um declínio marginal nos níveis de ferritina. Níveis elevados de  
28 ferritina nas primeiras 24 horas de internação foram relacionado à gravidade do AVE,  
29 maior área infartada e pior prognóstico (DÁVALOS et al., 1994, 2000). Além disto, altas  
30 concentrações de ferritina estão correlacionadas com maior conversão de AVEi para AVEh  
31 (CHOI et al., 2012; KAUSHIK; MITTAL; GUPTA, 2018). Todavia, Hachinski e colaboradores

1 (1996) não encontraram diferença nos níveis de ferritina entre pacientes com AVEi e  
2 controles.

### 3 1.1.7. Vitamina D

4

5 A vitamina D tem mostrado ter funções tróficas gerais relacionadas com a  
6 diferenciação, maturação e crescimento neuronal. A primeira evidência que implica um  
7 papel neurotrófico para a vitamina D foi adquirida a partir de estudos *in vitro* que  
8 demonstraram que a síntese do BDNF foi estimulada pela 1,25-dihidroxitamina D  
9 [1,25(OH)<sub>2</sub>D] (PRÜFER et al., 1999) e a relevância biológica deste fenômeno foi mais tarde  
10 confirmada em modelos *in vivo* de ratos adultos (BAAS et al., 2000). Além disto,  
11 demonstrou-se que a 1,25(OH)<sub>2</sub>D regula positivamente a síntese de fator neurotrófico  
12 derivado da linhagem de células da glia (GDNF) e neurotrofinas (LANGUB et al., 2001;  
13 NAVEILHAN et al., 1996).

14 Evidências sugerem um papel neuroprotetor para a vitamina D, e sua  
15 administração ou dos seus metabólitos mostrou reduzir a lesão neurológica e/ou  
16 neurotoxicidade em modelos experimentais, incluindo a atenuação da área isquêmica  
17 cerebral em ratos pela regulação positiva de GDNF e a diminuição da morte neuronal em  
18 culturas induzidas por neurotoxicidade (BREWER et al., 2001). Além disso, outros estudos  
19 demonstraram que o tratamento com 1,25(OH)<sub>2</sub>D aumentou os níveis de antioxidantes,  
20 além de inibir a síntese de NO pela óxido nítrico sintetase induzível (iNOS), reduzindo o  
21 estresse oxidativo e prevenindo a morte neuronal (GARCION et al., 1997, 1998, 1999;  
22 WANG et al., 2001). Huang e colaboradores (2015) analisaram o papel da vitamina D em  
23 culturas de células da glia e investigaram como a 1,25(OH)<sub>2</sub>D poderia afetar a  
24 neuroinflamação e observaram que o tratamento com a 1,25 (OH)<sub>2</sub>D suprimiu a produção  
25 de EROS induzidas por lipopolissacarídeo (LPS), reduziu a produção de IL-6 e a expressão da  
26 iNOS sem causar morte celular. Estes resultados sugerem um efeito neuroprotetor  
27 importante para a forma ativa da vitamina D, ao diminuir os danos oxidativos para o SNC.

28 Vários estudos associaram baixos níveis de 25-hidroxitamina D [25(OH)D] ao  
29 AVEi (MICHOS et al., 2012; SUN et al., 2012; BRØNDUM-JACOBSEN et al., 2013; CHAUDHURI  
30 et al., 2014; TU et al., 2014). No entanto, outros autores não encontraram diferenças da  
31 25(OH)D entre pacientes com AVEi e grupo controle (BOLLAND et al., 2010; DRECHSLER et  
32 al., 2010; GUPTA et al., 2014; MAJUMDAR et al., 2015).

1 Brøndum-Jacobsen e colaboradores (2013) verificaram que os indivíduos com  
2 menores níveis de 25(OH)D apresentaram maior risco de AVEi comparados com indivíduos  
3 com níveis suficientes de 25(OH)D durante 21 anos de seguimento. Sun e colaboradores  
4 (2012) avaliaram 464 mulheres com AVEi e 464 mulheres sem histórico de AVEi e  
5 demonstraram associação entre os baixos níveis de 25(OH)D e maior incidência de AVEi  
6 independente do estilo de vida e fatores dietéticos. Esta observação foi confirmada por  
7 uma metanálise realizada pelo mesmo grupo de pesquisadores que analisaram mais seis  
8 outros estudos prospectivos os quais, em geral, demonstraram as mesmas associações  
9 inversas entre os níveis de 25(OH)D e AVEi. Nosso grupo de pesquisas também mostrou a  
10 importante associação entre o status de deficiência de vitamina D com a ocorrência de  
11 AVEi e pior prognóstico a curto prazo (ALFIERI et al., 2017). Neste estudo, os pacientes com  
12 AVEi apresentaram níveis menores de 25(OH)D e maior frequência de deficiência de  
13 vitamina D (43,45% vs. 5,08%, OR: 16,64, IC 95%: 5,66-42,92). Pacientes com deficiência de  
14 vitamina D apresentaram níveis elevados de usPCR em relação àqueles com status de  
15 vitamina D suficientes (ALFIERI et al., 2017).

16

#### 17 1.1.8. Homocisteína

18

19 A homocisteína tem sido reconhecida como um fator de risco para DCV desde a  
20 década de 90. Estudos *in vivo* demonstram que altos níveis deste biomarcador contribuem  
21 para menor biodisponibilidade do NO, resultando em disfunção endotelial, contribuindo  
22 para aumento da pressão arterial, trombose e aterosclerose (ZHAO et al., 2017).

23 Estudos *in vitro* sugeriram que a hiperhomocisteinemia é capaz de induzir a  
24 produção de várias citocinas como a proteína quimiotática para monócitos (MCP)-1 ou  
25 CCL2 e IL-8 via ativação de NF- $\kappa$ B. Tais processos são reconhecidos por aumentar a ligação  
26 de monócitos ao endotélio e seu recrutamento para o espaço celular subendotelial, um  
27 passo crítico no desenvolvimento da aterosclerose (PODDAR et al., 2001). Zhang e  
28 colaboradores (2009), em estudo experimental, forneceram a primeira evidência de que os  
29 altos níveis de homocisteína contribuem para inflamação sistêmica e acelera a  
30 aterosclerose independentemente da hiperlipemia (ZHANG et al., 2009).

31 Na última década, observações epidemiológicas apontaram para uma  
32 associação plausível entre hiperhomocisteinemia e distúrbios neurodegenerativos do

1 SNC. Estudos demonstraram que a homocisteína é capaz de desencadear danos neuronais  
2 pelo aumento do estresse oxidativo, danos no DNA e ativação de fatores pró-apoptóticos  
3 em culturas de células ou modelos animais (CURRÒ et al., 2014). A homocisteína e seus  
4 compostos podem ter um papel como um agonista excitatório para receptores de  
5 glutamato do tipo NMDA, e também no envolvimento de sítios modulatórios para este  
6 receptor (PODDAR et al., 2001).

7 Os dados sobre concentrações de homocisteína em pacientes com AVEi são  
8 divergentes. Estudos mostraram que níveis elevados de homocisteína predizem,  
9 independentemente, o comprometimento neurológico grave, pior prognóstico e maior  
10 susceptibilidade ao AVEi (SHI et al., 2015; LI et al., 2017). Por outro lado, Lindgren e  
11 colaboradores (1995) compararam os níveis plasmáticos desta proteína nos períodos  
12 agudos e de convalescença após o AVEi, e descobriram que, em contraste com outros  
13 estudos, a concentração plasmática de homocisteína não diferiu entre casos e controles na  
14 fase aguda. Outros estudos relataram ausência de risco ao AVEi atribuível a  
15 hiperhomocisteinemia e, de fato, mostraram um declínio nos níveis desta proteína no  
16 período pós-isquemia, possivelmente representando uma resposta de fase aguda  
17 (LINDGREN et al., 1995; HAAPANIEMI et al., 2007; OKUBADEJO et al., 2008). Tem sido  
18 sugerido que, após uma reação inflamatória aguda, as concentrações de albumina sérica  
19 diminuem e a albumina seja a principal proteína de ligação a homocisteína plasmática, essa  
20 situação pode resultar na redução dos níveis plasmáticos totais de homocisteína  
21 (OKUBADEJO et al., 2008).

22

## 23 1.2. ESTRESSE OXIDATIVO E ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO

24

25 O SNC é particularmente susceptível ao estresse oxidativo devido ao elevado  
26 consumo de O<sub>2</sub>, resultando em produção excessiva de EROS, além da alta concentração de  
27 ácidos graxos poli-insaturados, os quais são particularmente vulneráveis ao ataque  
28 oxidativo (FRIEDMAN, 2011). Nos seres humanos, o cérebro representa apenas uma  
29 pequena percentagem do peso corporal, mas que processa 20,0% do consumo de O<sub>2</sub> basal.  
30 A cadeia respiratória mitocondrial é responsável pela maioria das EROS e, a níveis  
31 fisiológicos, 1,0 a 2,0% do O<sub>2</sub> consumido é convertido em EROS (EMERIT; EDEAS; BRICAIRE,  
32 2004). Além das EROS, formam-se ERNS, como o NO, um radical livre gasoso, altamente

1 difusível e importante mensageiro biológico, que desempenha um papel proeminente na  
2 fisiologia do SNC (YUN; DAWSON; DAWSON, 1996).

3 Após a isquemia, a reperfusão pode salvar o tecido cerebral; no entanto, pode  
4 potencialmente ter consequências negativas. Com a reoxigenação, o estresse oxidativo  
5 resulta rapidamente pelas reações de oxidação enzimáticas e não enzimáticas que ocorrem  
6 no citoplasma e em organelas celulares (CUZZOCREA et al., 2001; SCHALLER; GRAF, 2004).  
7 Durante a isquemia e reperfusão pode haver um aumento da formação de ânion  
8 superóxido ( $O_2^-$ ); além disso, a dismutação ou redução direta do  $O_2^-$  leva a formação de  
9 peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), que pode ser o precursor do radical hidroxila reativo ( $OH\bullet$ )  
10 (CHERUBINI et al., 2005).

11 A principal alteração que afeta os neurônios durante a isquemia é a exaustão  
12 de adenosina trifosfato (ATP) devido à falta de substratos para a sua produção, ou seja, de  
13  $O_2$  e de glicose (EMERIT; EDEAS; BRICAIRE, 2004). O acúmulo do ácido lático nos neurônios,  
14 como resultado de depleção de energia, promove um ambiente ácido culminando em um  
15 efeito pró-oxidante, com aumento da concentração de  $H^+$  e da taxa de conversão do  $O_2^-$  a  
16  $H_2O_2$ , ou a espécies mais reativas, o radical hidroxiperoxila ( $HO_2\bullet$ ) (SAEED et al., 2007). O  
17 resultado final da isquemia é o acúmulo intracelular de  $Ca^{2+}$  a partir de várias fontes que  
18 induzem a ativação de uma variedade de enzimas estimuladas pelo mesmo, tais como  
19 proteases, lipases, nucleases, proteína-quinases e óxido nítrico sintetase (NOS). Este é um  
20 importante mecanismo pelo qual o dano de estruturas celulares e subcelulares conduzem à  
21 morte neuronal.

22 Outra consequência relevante da isquemia é o aumento da produção de NO,  
23 um importante gás pleiotrópico que exerce processos fisiológicos e patológicos (KEYNES;  
24 GARTHWAITE, 2004; WARNER; SHENG; BATINIĆ-HABERLE, 2004). Três isoformas  
25 enzimáticas são responsáveis para a produção de NO: NOS neuronal (nNOS; tipo I), iNOS  
26 (tipo II) que é produzida em grandes quantidades por micróglia ativada (macrófagos) e NOS  
27 endotelial (eNOS; tipo III). No SNC, a expressão de nNOS é regulada por estímulos  
28 fisiológicos e fisiopatológicos (CHERUBINI et al., 2005). O papel benéfico ou nocivo do NO  
29 no AVEi depende do tipo de célula, da concentração de NO e do microambiente de  
30 isquemia.

31 Em geral, nNOS e iNOS desempenham um papel de lesão neuronal no estágio  
32 inicial para tardio do AVEi, enquanto a ativação de eNOS exerce principalmente efeitos de

1 neuroproteção. A ativação da iNOS aumenta a partir de 12 horas após a isquemia e este  
2 aumento pode permanecer por 1 semana (NIWA et al., 2001). Nesta fase, a iNOS é  
3 produzida principalmente por micróglia, astrócitos, células endoteliais e linfócitos  
4 infiltrantes. A quantidade de NO liberada pela iNOS é 1.000 vezes maior do que a da nNOS  
5 (PANNU; SINGH, 2006). NO pode reagir com  $O_2^-$  e originar peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) que pode  
6 ser protonado, formando o ácido peroxinitroso altamente reativo, que por sua vez, pode  
7 aumentar diretamente os danos cerebrais, reagir com várias moléculas biologicamente  
8 importantes ou pode ser convertido em  $OH^\bullet$  e outras espécies reativas, bem como ERNS  
9 (BECKMAN, 1994). A glia, quando ativada, pode expressar iNOS e produzir níveis elevados  
10 de NO e, com isto, induzir a morte neuronal em condições de hipóxia (MANDER et al.,  
11 2005). Em contraste, o NO gerado pela ativação da eNOS pode proteger o cérebro após o  
12 evento isquêmico agudo pelo aumento do fluxo sanguíneo e indução de angiogênese; além  
13 disso, pode inibir a apoptose e ajudar na reparação do cérebro pela estimulação da  
14 neurogênese, inibir a agregação plaquetária e prevenir a adesão de leucócitos ao  
15 endotélio (FARACI; BRIAN, 1994; STAGLIANO et al., 1997).

16 A superexpressão da iNOS pode promover a secreção  $TNF-\alpha$  e  $IL-1\beta$  (FONCEA et  
17 al., 2000; TRICKLER; MAYHAN; MILLER, 2005). Além disso, Kim e Snyder (2005)  
18 demonstraram que a iNOS se liga especificamente a COX-2, aumentando a atividade  
19 catalítica da COX-2, subsequentemente induzem a reação inflamatória secundária e  
20 geração de EROS e ERNS (KIM; HURI; SNYDER, 2005)

21 Inúmeros trabalhos realizados em modelos experimentais demonstram o papel  
22 do NO na isquemia cerebral (YAN 2015; MOHAMMADI et al., 2016; CHEN 2017) no  
23 entanto, em humanos, os relatos são escassos e divergentes. Alguns autores  
24 demonstraram que as concentrações periféricas de NO em pacientes com AVE são  
25 menores do que na população saudável (ABDULLAH et al., 2013; RASHID et al., 2003;  
26 SERRANO-PONZ et al., 2016), enquanto outros estudos descreveram níveis mais elevados  
27 em comparação com controles (CASTILLO; RAMA; DÁVALOS, 2000; CURE et al., 2013;  
28 GUMANOVA et al., 2015), além de contribuir para o pior prognóstico à curto prazo  
29 (CASTILLO; RAMA; DÁVALOS, 2000; ZHENG et al., 2016). Essa discrepância pode ser  
30 explicada, em parte, pelas diferenças nas metodologias empregadas ou no tempo de  
31 inclusão do paciente nos estudos.

1 Além das EROS e ERNS, a peroxidação lipídica é uma das principais  
2 consequências da lesão mediada por radicais livres para o cérebro. A peroxidação de ácidos  
3 graxos poli-insaturados, principalmente fosfolipídios de membrana, é uma reação em  
4 cadeia que pode continuar até que o substrato seja completamente consumido ou que a  
5 rescisão ocorra devido a ação de antioxidantes. Esta reação em cadeia produz danos  
6 estruturais e funcionais das membranas, bem como vários produtos secundários (ALLEN;  
7 BAYRAKTUTAN, 2009; CHERUBINI et al., 2005)

8 O cérebro contém altos níveis de ácidos graxos poli-insaturados e, portanto, a  
9 peroxidação lipídica é uma das principais consequências da lesão por estresse oxidativo  
10 (BAZINET; LAYÉ, 2014). Inicialmente, a peroxidação lipídica leva à produção de  
11 hidroperóxidos diênicos conjugados. Estas substâncias instáveis podem decompor, em  
12 vários aldeídos, como o malondialdeído (MDA) e o 4-hidroxinonenal (4-HNE).  
13 Historicamente, os primeiros biomarcadores de dano oxidativo de lipídios do cérebro que  
14 foram avaliados foram os aldeídos, tais como MDA, 4-HNE e substâncias reativas ao ácido  
15 tiobarbitúrico. Além destes, os 8-isoprostanos são formados por peroxidação catalisada por  
16 radicais livres não enzimáticos do ácido araquidônico presente nos fosfolipídios. Os 8-  
17 isoprostanos são formados após lesão cerebral e são gerados principalmente dentro de 24  
18 horas após a isquemia. Outro fator importante, é que o 8-isoprostanos também podem ter  
19 efeitos potentes de vasoconstrição na circulação periférica, contribuindo para o aumento  
20 da sensibilidade do cérebro ao estresse oxidativo (HOFFMAN; ROOF; STEIN, 1996).

21 Vários estudos demonstraram que os níveis de metabólitos da peroxidação  
22 lipídica são mais elevados em pacientes com AVEi agudo quando comparado aos controles.  
23 Além disso, os níveis de MDA foram correlacionados positivamente com a área infartada e  
24 a gravidade clínica dos pacientes (GARIBALLA; HUTCHIN; SINCLAIR, 2002; POLIDORI et al.,  
25 2002; INGRID et al., 2016).

26

### 27 1.3. MARCADORES METABÓLICOS E ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO

28

#### 29 1.3.1. Diabetes *mellitus* tipo 2 (DM)

30

31 Dentre alguns fatores de risco modificáveis do AVEi estão a lesão  
32 aterosclerótica, dislipidemia e o DM. A principal causa de AVEi é a aterosclerose, sendo

1 essa uma doença inflamatória crônica na qual os mecanismos imunes podem interagir com  
2 outros fatores de risco como DM e, com isto, iniciar, ativar e propagar desordens  
3 vasculares nesses pacientes.

4 Estudos epidemiológicos têm mostrado que DM é um fator de risco  
5 independente para incidência (AL-RUBEAN et al., 2016) e recorrência de AVEi (SHOU et  
6 al., 2015). Muitas vias deletérias envolvidas no agravamento do distúrbio cerebrovascular  
7 que resulta do DM foram relatadas, tais como disfunção endotelial vascular (VENKAT;  
8 CHOPP; CHEN, 2017), disfunção mitocondrial, estresse oxidativo (MISHIRO et al., 2014),  
9 aumento da permeabilidade da BHE e inflamação sistêmica (SHUKLA et al., 2017).

10 A hiperglicemia e o estresse hiperglicêmico são fenômenos comuns  
11 apresentados na fase inicial do AVEi agudo. Um estudos experimental mostrou que a  
12 hiperglicemia aguda, que ocorre pouco antes ou durante a isquemia, exacerba a lesão  
13 isquêmica (MARTINI; KENT, 2007). Este aumento pode estar relacionado ao estado de não  
14 jejum e reação ao estresse com metabolismo de glicose prejudicado. O AVEi desencadeia  
15 uma reação de estresse generalizada envolvendo a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-  
16 adrenal, que leva subsequentemente a níveis aumentados de glicocorticoides séricos,  
17 ativação do sistema nervoso autônomo simpático e aumento da liberação de  
18 catecolaminas. O aumento dos níveis de hormônios do estresse aumenta as taxas de  
19 glicólise aeróbica, promove a liberação de glicose a partir da gliconeogênese e da  
20 glicogenólise e inibe a glicogênese mediada pela insulina (CHEN; OVBIAGELE; FENG, 2016).

21 O nível inicial de glicose plasmática está altamente correlacionado com pior  
22 prognóstico. A hiperglicemia aguda aumenta a produção de lactato cerebral e contribui  
23 para aumento da área infartada. Em modelo animal, a hiperglicemia aumenta o volume do  
24 tamanho médio das lesões em 118% e o volume sanguíneo cerebral hemisférico é reduzido  
25 em 37% em ratos hiperglicêmicos em comparação com ratos normoglicêmicos (QUAST et  
26 al., 1997).

27 A presença de DM e hiperglicemia foram correlacionas com área de penumbra  
28 (ROSSO et al., 2011), o que contribui para pior prognóstico (HU et al., 2012) e  
29 comprometimento cognitivo (LI et al., 2016) após AVEi. Além disso, a hiperglicemia crônica  
30 agrava a transformação hemorrágica após AVEi por meio da disfunção mitocondrial e  
31 alterações morfológicas, parcialmente via ativação de MMP-9; além de contribuir para a

1 morte celular apoptótica dependente de caspases nas células endoteliais (MISHIRO et al.,  
2 2014).

3           Em contrapartida, Capes e colaboradores (2001) demonstraram, por metanálise  
4 envolvendo 32 estudos, que pacientes sem histórico de DM, o estresse hiperglicêmico  
5 estava associado a um risco três vezes maior de mortalidade após o AVEi. Além disso, os  
6 pacientes não diabéticos com maiores níveis de glicose na admissão tiveram maior risco de  
7 pior prognóstico. Por outro lado, em pacientes diabéticos, o estresse hiperglicêmico não foi  
8 associado à mortalidade a curto prazo após o AVEi. Posteriormente, outros autores  
9 corroboram com o estudo de Capes et al., (2001), mostrando que pacientes com estresse  
10 hiperglicêmico apresentaram maior gravidade na admissão do que pacientes diabéticos e  
11 pacientes sem estresse hiperglicêmico (JIA et al., 2014; TZIOMALOS et al., 2017).

12

### 13 1.3.2. Dislipidemia

14

15           A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica de origem multifatorial. A  
16 formação da placa aterosclerótica inicia-se com a agressão ao endotélio vascular por  
17 diversos fatores de risco, como dislipidemia, hipertensão arterial ou tabagismo. Como  
18 consequência, a disfunção endotelial aumenta a permeabilidade da íntima às lipoproteínas  
19 plasmáticas, favorecendo a retenção destas no espaço subendotelial. Retidas, as partículas  
20 de LDL sofrem oxidação, causando a exposição de diversos neoepítomos, tornando-as  
21 imunogênicas. O depósito de lipoproteínas na parede arterial, processo chave no início da  
22 aterogênese, ocorre de maneira proporcional à concentração destas lipoproteínas no  
23 plasma. Além do aumento da permeabilidade às lipoproteínas, outra manifestação da  
24 disfunção endotelial é o surgimento de moléculas de adesão leucocitária na superfície  
25 endotelial, processo estimulado pela presença de LDL-oxidada. Induzidos por proteínas  
26 quimiotáticas, os monócitos migram para o espaço subendotelial, no qual se diferenciam  
27 em macrófagos, que, por sua vez, captam as LDL oxidadas. Estes secretam citocinas, que  
28 amplificam a inflamação, e enzimas proteolíticas, capazes de degradar colágeno e outros  
29 componentes teciduais locais. As complicações, como a ruptura da placa aterosclerótica ou  
30 erosão endotelial, são fatores de risco para as DCV, como o AVEi (HACHINSKI et al., 1996;  
31 LEE et al., 2017; PENG et al., 2017).

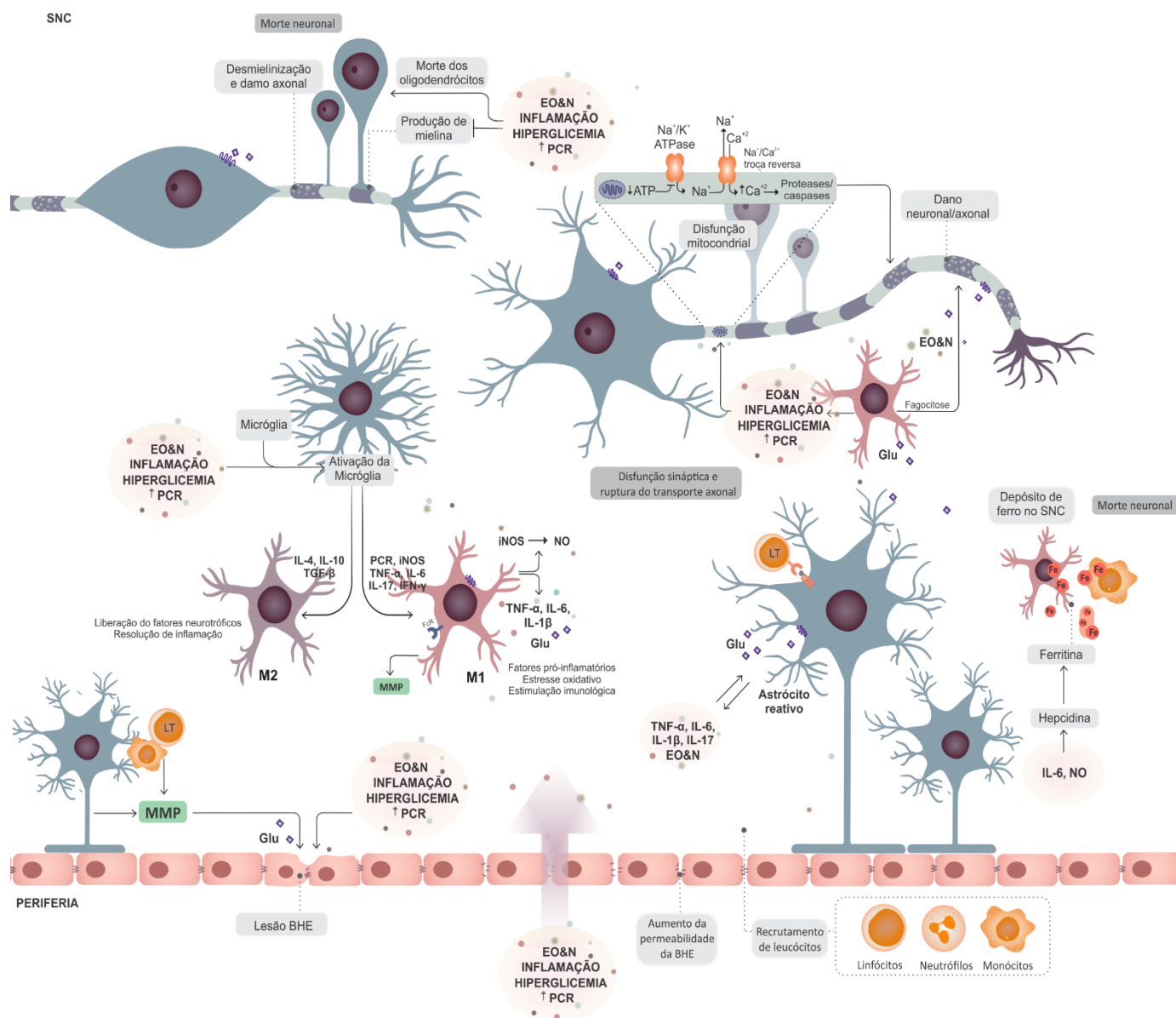
1           Dados conflitantes têm sido relatados em pacientes com AVEi em relação à  
2   associação entre dislipidemia, gravidade e desfecho. Paradoxalmente, vários estudos  
3   relataram maior gravidade e pior evolução em pacientes com níveis de colesterol total (CT)  
4   mais baixos (KOTON et al., 2012; TUTTOLOMONDO et al., 2013). No entanto, outros não  
5   encontraram associação entre os níveis de CT ou LDL e a gravidade ou desfecho do AVEi  
6   (JAIN et al., 2013; WEIR et al., 2003). Inesperadamente, os pacientes com níveis mais baixos  
7   de triglicerídeos (TG) também apresentaram maior gravidade do evento isquêmico (WEIR  
8   et al., 2003; DZIEDZIC et al., 2004; TZIOMALOS et al., 2016), mas outros estudos relataram  
9   níveis mais elevados de TG em pacientes com pior prognóstico (SIMUNDIC et al., 2008). Por  
10  outro lado, baixos níveis de lipoproteína de alta densidade (HDL) demonstram ter um  
11  melhor papel preditivo tanto para a incidência quanto para o prognóstico do AVEi (YUAN  
12  et al., 2015; RYU et al., 2016; TZIOMALOS et al., 2016).

13           Em relação ao tratamento com hipolipemiantes, estudos observacionais  
14  relataram que pacientes que estavam em uso prévio de estatinas apresentaram melhores  
15  resultados após o evento isquêmico (ASLANYAN et al., 2005; REEVES et al., 2008). Em um  
16  estudo piloto, randomizado e controlado por placebo, a sinvastatina 20-40 mg/dia  
17  administrada dentro das primeiras 3-12 h por 90 dias melhorou o estado neurológico, mas  
18  não o resultado funcional (MONTANER et al., 2007). Evidências moderadas mostraram que  
19  a classe dos fibratos pode ser eficaz na prevenção secundária de AVEi e infarto agudo do  
20  miocárdio (IAM) (WANG et al., 2015). Já o uso de ezetimiba mostrou evidências moderada  
21  a alta quanto aos efeitos benéficos nos desfechos das DCV, impulsionados principalmente  
22  por uma redução no IAM não fatal e AVEi não fatal, mas tem pouco ou nenhum efeito nos  
23  desfechos clínicos fatais. O benefício cardiovascular da ezetimiba pode envolver a redução  
24  de LDL, CT e TG. A evidência de efeitos benéficos foi obtida principalmente de indivíduos  
25  com DCV aterosclerótica estabelecida, administrados com ezetimiba e estatinas. No  
26  entanto, existem evidências limitadas sobre o papel da ezetimiba na prevenção primária e  
27  os efeitos da monoterapia com ezetimiba na prevenção de DCV (ZHAN et al., 2018). Do  
28  mesmo modo, o tratamento com niacina não diminuiu a incidência e mortalidade por AVEi  
29  em ensaios clínicos randomizados (SCHANDELMAIER et al., 2017).

30           A Figura 3 sumariza os principais mecanismos inflamatórios, metabólicos e de  
31  estresse oxidativo/nitrosativo envolvidos na fisiopatologia do AVEi.

32

1 **Figura 3** Principais mecanismos inflamatórios, metabólicos e de estresse  
 2 oxidativo/nitrosativo envolvidos na fisiopatologia do AVEi



4 SNC: sistema nervoso central; BHE: barreira hematoencefálica; EO&N: estresse oxidativo e Nitrosativo; IL-  
 5 interleucina; PCR: proteína C-reativa; LT: linfócito T; MMP: metaloproteinase; TNF: fator de necrose tumoral;  
 6 NO: óxido nítrico; iNOS: óxido nítrico sintetase induzível; Glu: glutamato; TGF: fator de crescimento  
 7 transformador; M1: fenótipo tipo 1, M2: fenótipo tipo 2.

8 Fonte: Próprio autor

9

10 1.4 POLIMORFISMO NO GENE DA PROTEÍNA C-REATIVA

11

12 Em adição às variáveis ambientais, ao comportamento do paciente e aos  
 13 fatores clínicos, há um adicional e substancial componente genético que influencia os  
 14 níveis séricos de PCR. No entanto, a extensão do quanto as variáveis clínicas e genéticas,  
 15 em conjunto, são responsáveis pela variação total no nível sérico de PCR é incerta. Uma

1 hereditariedade moderada nos níveis de PCR tem sido relatada em estudos familiares com  
2 gêmeos, sugerindo que os fatores genéticos podem contribuir entre 30% a 60% na variação  
3 total nos níveis plasmáticos dessa proteína (PANKOW et al., 2001; MACGREGOR et al.,  
4 2004;). Um estudo realizado com 2.163 indivíduos provenientes de uma grande variedade  
5 de famílias demonstrou que fatores genéticos compartilhados eram responsáveis por cerca  
6 de 40% das variações nos níveis da PCR (PANKOW et al., 2001). Em outro estudo, a  
7 hereditariedade estimada para os níveis de PCR variou de 27% a 40%, sugerindo um papel  
8 importante na variação da sequência de DNA (com a presença de vários polimorfismos)  
9 como determinante nos níveis séricos dessa proteína (DUPUIS et al., 2005).

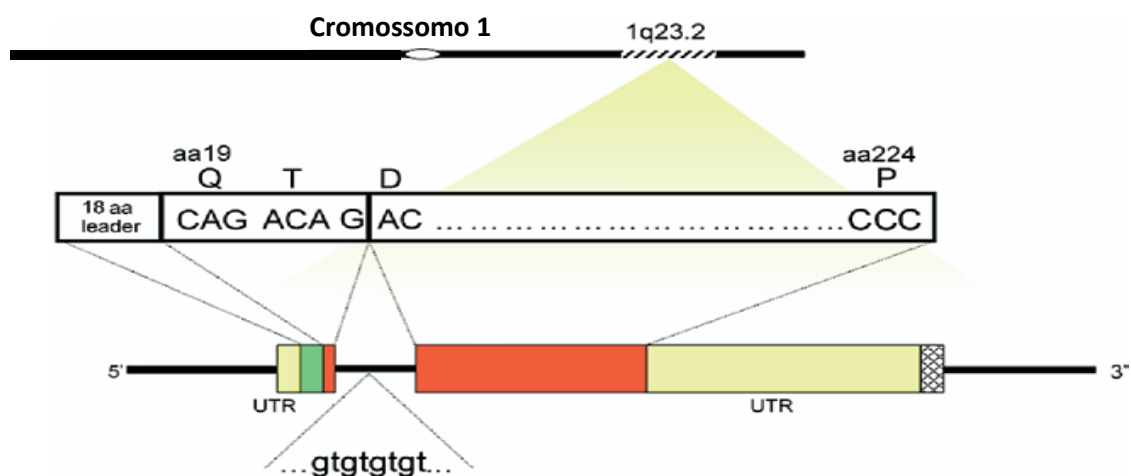
10 Polimorfismos no gene *PCR* e em genes que controlam a sua expressão influenciam  
11 os níveis dessa proteína (LAWLOR et al., 2008). O gene *PCR* localiza-se no braço longo do  
12 cromossomo 1 humano, na região denominada 1q23.2, é composto por aproximadamente  
13 2.000 pares de bases (pb) e por um íntron separando dois éxons. O grupo conduzido por  
14 Woo, Korenberg e Whitehead (1985) descobriu que o gene *PCR* possui uma região não  
15 transcrita (3'-UTR) desproporcionalmente longa, sugerindo um possível papel regulatório  
16 para essa sequência. O primeiro éxon codifica um peptídeo sinal e os dois primeiros  
17 aminoácidos da proteína final. Ele é seguido por um íntron composto por 278 nucleotídeos  
18 de comprimento, o qual inclui uma sequência em repetição GT. O segundo éxon codifica os  
19 204 aminoácidos restantes da proteína e é seguido por um códon de parada (HAGE;  
20 SZALAI, 2007). A Figura 4 mostra a constituição do gene *PCR*.

21

22

1 **Figura 4** Constituição do gene da proteína C-reativa (PCR)

2



3

4 O gene *PCR* está localizado no cromossomo 1 humano e é composto por 2 éxons (caixas vermelhas)  
 5 separados por um único íntron que apresenta uma região com repetição de dinucleotídeos (gt). O éxon 1  
 6 codifica um peptídeo sinal com 18 aminoácidos (caixa verde) e os 2 primeiros aminoácidos da proteína  
 7 madura. O éxon 2 codifica os 204 aminoácidos restantes da proteína madura e é seguido por um códon de  
 8 parada. UTR = regiões não transcritas (caixas amarelas).

9 Fonte: Hage e Szalai (2007).

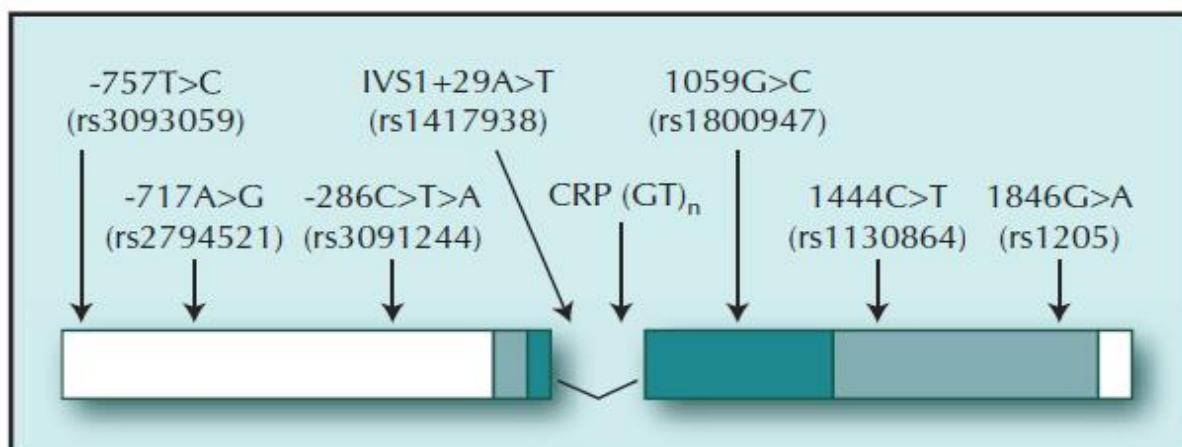
10

11 Os polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) representam uma variação  
 12 muito comum no gene *PCR* (YE et al., 2018) e cada um deles parece afetar os níveis séricos  
 13 de PCR de maneira diferente, avaliados em diversas doenças (BRULL et al., 2003;  
 14 NIMPTSCH et al., 2014; DELONGUI et al., 2017). Enquanto alguns foram associados com  
 15 aumento nos níveis séricos de PCR, como os rs3093059, rs3091244'T', rs3091244'A',  
 16 rs1417938 e rs1130864, outros foram associados com menores níveis basais de PCR, como  
 17 os rs1800947 e rs1205. Além destes, o polimorfismo rs2794521 parece não alterar os  
 18 valores séricos dessa proteína (SUK DANIK et al., 2006). A figura 5 ilustra a localização dos  
 19 SNPs mais estudados no *PCR*.

20

21

- 1 **Figura 5** Localização dos principais polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs)  
 2 estudados no gene *PCR* presente no cromossomo 1 humano.



3 O gene *PCR* consiste de dois éxons (caixas verdes) separados por um único íntron. As regiões de codificação  
 4 dos éxons 1 e 2 (caixas verde escuras) correspondem a um peptídeo de 206 aminoácidos separados pelo  
 5 íntron que contém regiões de microssatélites com repetição (GT)<sub>n</sub>. Uma região 5'-não transcrita curta (104  
 6 pares de base) e uma região 3'-não transcrita relativamente longa (1,2kb) flanqueiam o gene (caixas verde  
 7 claras). As regiões promotoras são as caixas brancas. Os SNPs estão identificados de acordo com a  
 8 nomenclatura comumente referenciada na literatura e, entre parênteses, de acordo com o identificador  
 9 dbSNP incluído para referência no banco de dados SNP do Centro Nacional de Biotecnologia. Fonte: Danik e  
 10 Ridker (2007).

11 Em uma grande coorte sobre risco cardiovascular, realizado por Carlson et al.,  
 12 (2005) foi demonstrado uma associação de vários SNPs no gene da *PCR*, localizados na  
 13 região promotora, com níveis os plasmáticos de *PCR*. Porém, Hage e Szalai (2007)  
 14 observaram a escassez e inconsistências de estudos que examinaram SNPs no *PCR* com  
 15 desfechos cardiovasculares, mas sugeriram que se pudesse ser estabelecido que as  
 16 variantes no *PCR* estavam fortemente associadas a eventos coronarianos; portanto, o perfil  
 17 das formas variantes do *PCR* poderia ter utilidade clínica em previsão das DCV (HAGE;  
 18 SZALAI, 2007).

19 Muiño e colaboradores (2015) avaliaram 68 SNPs em 30 genes selecionados da  
 20 literatura que estariam relacionados às vias inflamatórias associadas ao AVEi. Dentre estes,  
 21 o polimorfismo rs1130864 que está localizado na região 3'UTR do gene, sendo  
 22 caracterizado pela substituição de uma citosina (C) por uma timina (T) na posição +1444,  
 23 por encontrar-se em uma região não codificadora, não altera a estrutura da proteína  
 24 sintetizada, mas pode estar relacionado com a regulação da expressão da *PCR* devido a  
 25 alteração da estabilidade do RNA mensageiro (RNAm) produzido (YAN et al., 2007).

1 Poucos estudos avaliaram o polimorfismo rs1130864 com a suscetibilidade ao  
2 AVEi e o desfecho tanto a curto como a longo prazo. Além disso, os resultados são  
3 inconsistentes (Tabela 1). Landevall e colaboradores (2006), em uma corte sueca, avaliaram  
4 600 pacientes com AVEi e 600 controles e demonstraram que as variantes polimórficas do  
5 *PCR*, inclusive o polimorfismo rs1130864, não foram fatores de risco independentes para o  
6 AVEi; porém, são fatores de risco quando avaliados em haplótipos. Este achado foi  
7 reproduzido por dois estudos prospectivos com 152 e 267 pacientes com AVEi no Japão e  
8 Suécia, respectivamente (MORITA; NAKAYAMA; SOMA, 2006; ANDERSSON et al., 2009).

9 Sabe-se que variantes genéticas funcionais no gene *PCR* parecem influenciar  
10 seu nível de proteína independentemente de outras variáveis, como o índice de massa  
11 corporal (IMC) e IL-6 (BRULL et al., 2003; KOMURCU-BAYRAK et al., 2009; SINGH et al.,  
12 2014).

13 Lawlor e colaboradores (2008), por meio de metanálise envolvendo 18.637  
14 participantes, demonstraram que o polimorfismo rs1130864 foi associado à *PCR* circulante  
15 em todas as coortes; com a proporção combinada de médias geométricas, o genótipo TT  
16 apresentou maior média de *PCR* quando comparado aos genótipos CT+CC. Embora o  
17 estudo demonstre associações robustas do polimorfismo rs1130864 com a *PCR* circulante,  
18 este polimorfismo explicou apenas uma pequena proporção de 0,4 a 0,8% das alterações  
19 desta proteína (LAWLOR et al., 2008). Por outro lado, o *C Reactive Protein Coronary Heart*  
20 *Disease Genetics Collaboration (CCGC)*, realizou metanálise com randomização mendeliana,  
21 o qual foram incluídos 46.557 pacientes com doença arterial coronariana (DAC) de 15  
22 países diferentes. Os autores mostraram que o rs1130864 está associado com a DAC;  
23 porém, este mesmo polimorfismo demonstrou contribuir 30% (IC 95%: 26% a 34%) nas  
24 alterações séricas da *PCR* (WENSLEY et al., 2011).

25 A variação genética dentro da 3'UTR de genes imunes é um forte determinante  
26 da resposta imune interferindo na estabilidade/degradação do mRNA, exportação nuclear,  
27 localização subcelular e eficiência da tradução (CONNE; STUTZ; VASSALLI, 2000; MIGNONE  
28 et al., 2002). O mRNA da *PCR* é conhecido por ter uma meia vida curta de  
29 aproximadamente 2,5 horas (LOZANSKI et al., 1996). Portanto, a regulação da estabilidade  
30 do mRNA é um passo potencialmente importante na produção da *PCR*. Além disso,  
31 variações de sequência podem interromper os sítios de ligação de microRNAs (miRNAs)  
32 e/ou *RNA-binding proteins* (RBPs), alterando sua capacidade de regular transcritos

1 (SCHWERK; SAVAN, 2015). Portanto, supõe-se que indivíduos portadores de certos alelos  
2 variantes do *PCR* associados a níveis mais elevados de PCR apresentem maior risco de DCV  
3 (LADENVALL et al., 2006).

4 No entanto, em pacientes com AVEi avaliados por estudos prévios, a associação  
5 entre a variante polimórfica de rs1130864 e os níveis de PCR são conflitantes. Estudos  
6 caso-controle mostraram que indivíduos com genótipos CT+TT apresentaram níveis mais  
7 altos de usPCR do que aqueles com genótipo CC (LADENVALL et al., 2006; ANDERSSON et  
8 al., 2009). Por outro lado, Shulz e colaboradores (2016), em uma coorte da Alemã,  
9 demonstraram que os genótipos CT+TT de pacientes com IAM, AVE e AIT não estavam  
10 associados a níveis elevados de usPCR após ajuste para idade, sexo, IMC, tabagismo e DM.  
11 Outros estudos com pacientes com AVEi também não encontraram associação entre o  
12 alelo T e os níveis de PCR (MONTANER et al., 2006; MORITA; NAKAYAMA; SOMA, 2006; DU  
13 et al., 2015). Estes resultados controversos podem ser devido a diferenças no perfil  
14 genético dos indivíduos, tamanho da amostra e desenho do estudo e justificam a realização  
15 de estudos adicionais em diferentes grupos étnicos para validar estes achados.

16 Diante desse cenário, fica evidente a importância de SNPs no gene *PCR* que  
17 possam estar envolvidos na variabilidade dos níveis séricos da PCR e na suscetibilidade  
18 genética ao AVEi, o que os tornam atraentes candidatos no estudo da fisiopatologia desta  
19 doença.

1 Tabela 1 Polimorfismos no gene *PCR* avaliados em pacientes com acidente vascular encefálico isquêmico

Amostra/País	dbSNP <sup>a</sup>	Local	Frequência Alélica maior/menor	Efeito	Referência	
<b>Ásia</b>						
158 AVEi 290 Controles/ China	rs1130864 rs3093059	+1444 C>T +757 T>C	3'UTR 5'Flanking	Caso: 0,949/0,051 Controle: 0,927/0,073 Caso: 0,804/0,196 Controle: 0,838/0,162	Ausência de efeito Ausência de efeito	(DU et al., 2015)
3360 AVEi China/	rs1800947 rs1130864	+1059 G>C +1444 C>T	Éxon 2 3'UTR	0,928/0,072 0,946/0,054	Ausência de efeito Alelo T associado com pior prognóstico após 3 meses	(GUO et al., 2014)
	rs1341665	-7180C > T	5'Flanking	Caso: 0,710/0,290 Controle: 0,675/0,325	Ausência de efeito	
152 AVEi 304 Controles/ Japão	rs1800947 rs1130864 rs1205	+1059 G>C +1444 C>T +1846 G>A	Éxon 2 3'UTR 3'UTR	Caso: 0,960/0,04 Controle: 0,982/0,018 Caso: 0,930/0,07 Controle: 0,934/0,066 Caso: 0,697/0,303 Controle: 0,656/0,344	Alelo C associado com AVEi Genótipos CC+GC fator independente para AVEi Ausência de efeito Ausência de efeito	(MORITA; NAKAYAMA; SOMA, 2006)
					Haplótipo C-C-C Associado com AVEi	
Amostra/País	dbSNP <sup>a</sup>	Local	Frequência Alélica	Efeito	Referência	

maior/menor						
<b>Europa</b>						
	rs1800947	+1059 G>C	Éxon 2	0,934/0,066	Alelo C associado com AVEi LAC	
1669 AVEi/ Alemanha	rs1130864	+1444 C>T	3'UTR	0,676/0,324	Alelo C associado com AVEi LAC	(KUHLENBAEUMER et al., 2010)
	rs1205	+1846 G>A	3'UTR	0,661/0,339	Ausência de efeito	
	rs3093075	C>A	3'Flanking	0,945/0,055	Alelo C associado com AVEi LAC	
	rs2794521	-7317 T>C	5'Flanking	-	Ausência de efeito	
	rs3091244	-286 C>T>A	5'Flanking	-	Alelo T associado ao aumento dos níveis PCR nos controles	
600 AVEi 600 Controles/ Suécia	rs1800947	+1059 G>C	Éxon 2	-	Alelo C associado com AVEi cardioembólico; Alelo T associado a diminuição dos níveis de PCR nos controles	(LADENVALL et al., 2006)
	rs1130864	+1444C>T	3'UTR	-	Alelo T associado ao aumento dos níveis de PCR nos controles	
267 AVEi 546 Controles/ Suécia	rs1130864	+1444 C>T	3'UTR	Caso: 0,728/0,272 Controle: 0,718/0,282	Genótipo TT associado com aumentos nos níveis de PCR	(ANDERSSON et al., 2009)
185 AVEi/ Holanda	rs1130864	+1444 C>T	3'UTR	0,741/0,259	Haplótipo CCG associado ao aumento dos níveis de PCR	(DEN HERTOGE et al., 2010)
	rs1205	+2042 C>T <sup>b</sup>	3'UTR	0,655/0,345		
	rs3093068	+2911C>G	3'Flanking	0,914/0,086		
<b>Amostra/País</b>	<b>dbSNP<sup>a</sup></b>	<b>Local</b>	<b>Frequência Alélica</b>	<b>Efeito</b>	<b>Referência</b>	

maior/menor						
<b>Europa</b>						
151 AVEi/ Espanha	rs1800947	+1059 G>C	Éxon 2	0,940/0,060	Ausência de Efeito	(MONTANER et al., 2006)
	rs1130864	+1444 C>T	3'UTR	0,765/0,235	Ausência de Efeito	
	rs1800947	+1059 G>C	Éxon 2	-	Genótipo GG associado com aumentos nos níveis de PCR	
939 AVEi/AIT/IAM/ Alemanha	rs1417938	IVS1+29A>T	Íntrons	-	Ausência de Efeito	(SCHULZ et al., 2016)
	rs1130864	+1444 C>T	3'UTR	-	Ausência de Efeito	
	rs3093077		Éxon 2	-	Ausência de Efeito	
<b>América do Norte</b>						
	rs3093059	-757 C>T	5'Flanking	-		
	rs2794521	-717 A>G	5'Flanking	-		
264 AVEi	rs3091244	-286 C>T>A	5'Flanking	-		(MILLER et al., 2005)
264 Controles/ Estados unidos	rs1417938	IVS1+29A>T	Íntrons	-	Ausência de efeito	
	rs1800947	+1059 G>C	Éxon 2	-		
	rs1205	1846G>A	3'UTR	-		
	rs1130864	+1444 C>T	3'UTR	-		

- 1 rs, reference single nucleotide polymorphism; AVEi, Acidente vascular encefálico isquêmico; 3' UTR, região 3' não transcrita (3' *untranslated region*); PCR, Proteína C
- 2 reativa; AIT, Acidente isquêmico transitório; IAM: infarto agudo do miocárdio; LAC: lacunar.
- 3 <sup>a</sup>A identificação e determinação de *major/minor* alelo está de acordo com a base de dados de *Single Nucleotide Polymorphisms* (dbSNP) do *National Center of*
- 4 *Biothecnology Information* (NCBI); <sup>b</sup>rs1205 descrito como +2042 C>T.

1   **2.           JUSTIFICATIVA**

2

3           Muitos estudos avaliaram o efeito de biomarcadores inflamatórios, de  
4   estresse oxidativo ou genéticos de maneira isolada na ocorrência e prognóstico do  
5   AVEi. Diante da fisiopatologia complexa e multifatorial do AVEi, a primeira justificativa  
6   do presente estudo é que, até a presente data, não há estudos que avaliem  
7   concomitantemente os biomarcadores inflamatórios, metabólicos e de estresse  
8   oxidativo em pacientes com AVEi. Outra justificativa é que a maioria dos estudos da  
9   associação entre as variantes genéticas do *PCR* e o AVEi foi realizada em populações  
10   geneticamente mais homogêneas comparadas à população brasileira; destes, cinco  
11   estudos que avaliaram o papel do polimorfismo rs1130864 associados à suscetibilidade  
12   ao AVEi, foram realizados na população sueca e oriental, o que limita a generalização  
13   dos resultados previamente publicados para a população brasileira. Outra justificativa  
14   é a obtenção de resultados contraditórios na literatura sobre a associação entre o  
15   polimorfismo rs1130864 no gene *PCR* e os níveis séricos de PCR e a disfunção  
16   neurológica tanto a curto como a longo prazo em pacientes com AVEi.

17           Acreditamos que os resultados do presente estudo possam propor um  
18   modelo de biomarcadores para identificar, precocemente, um indivíduo com maior  
19   possibilidade de ter um AVEi agudo bem como uma maior incapacidade neurológica, a  
20   curto prazo, após este evento isquêmico. Os resultados podem, também, apontar  
21   possíveis novas estratégias terapêuticas que teriam como alvo a modulação das  
22   alterações das vias inflamatórias, metabólicas, do estresse oxidativo e nitrosativo e,  
23   quando associados ao tratamento atualmente empregado, possam melhorar o  
24   prognóstico dos pacientes com AVEi agudo.

25

1 **3. OBJETIVO**

2

3 3.1. OBJETIVO GERAL

4

5 Avaliar os biomarcadores inflamatórios, metabólicos, de estresse  
6 oxidativo/nitrosativo e o polimorfismo rs1130864 no gene *PCR* associados à  
7 suscetibilidade ao AVEi, assim como propor um modelo de biomarcadores que possam  
8 prever a incapacidade funcional na admissão e no prognóstico a curto prazo.

9

10 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

11

12 ■ Descrever as características demográficas, antropométricas, epidemiológicas e  
13 clínicas dos pacientes com AVEi agudo e do grupo controle;

14

15 ■ Determinar a associação entre as características demográficas,  
16 antropométricas, epidemiológicas, clínicas e biomarcadores IMO&NS com a  
17 suscetibilidade ao AVEi e a incapacidade funcional na entrada hospitalar e após  
18 3 meses;

19

20 ■ Avaliar os melhores biomarcadores avaliados que estão associados com a  
21 incapacidade funcional na entrada hospitalar e após 3 meses dos pacientes  
22 com AVEi;

23

24 ■ Avaliar a frequência do polimorfismo rs1130864 no gene *PCR* nos pacientes  
25 com a AVEi e no grupo controle;

26

27 ■ Determinar a associação entre as características demográficas,  
28 antropométricas, epidemiológicas, clínicas, biomarcadores IMO&NS e a  
29 incapacidade funcional nos pacientes com AVEi agudo de acordo com o  
30 polimorfismo rs1130864 no gene *PCR*

## 1   **4       MATERIAIS E MÉTODOS**

2

### 3   4.1.       ASPECTOS ÉTICOS

4

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

11

### 12   4.2.       DELINEAMENTO

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

15

### 16   4.3        POPULAÇÃO

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

24

### 25   4.4        CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

26

27               Foram seguidos os seguintes critérios de exclusão: pacientes que se  
28   recusaram a participar do estudo; presença de processo inflamatório agudo,  
29   autoimune ou infeccioso; pacientes em uso crônico de corticosteroides ou

1 imunossupressores; portadores de doença renal crônica, hepatopatia crônica,  
2 neoplasias, doença de Alzheimer, doença de Parkinson; os que apresentaram AIT,  
3 AVEh ou IAM; pós-operatório imediato; trauma nos últimos 30 dias; pacientes com  
4 dados incompletos ou que não tinham amostra biológica para as análises laboratoriais  
5 previstas.

6

#### 7 4.5 AMOSTRA

8

9 Trata-se de uma amostra consecutiva, de conveniência de tempo e local,  
10 com a inclusão, prospectivamente, de 176 pacientes com AVEi agudo, diagnosticados  
11 pelo exame clínico e TC de crânio e/ou RNM. O AVEi agudo foi diagnosticado como  
12 déficit focal ao exame neurológico, com ou sem distúrbio de consciência; início súbito,  
13 agudo ou rapidamente progressivo que persistiu por >24 horas confirmado por TC de  
14 crânio e/ou RNM. Os subtipos de AVEi foram classificados segundo os critérios  
15 definidos pelo *Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment (TOAST)*, que inclui 5  
16 categorias dependendo dos dados clínicos, dos exames laboratoriais e de imagem, tais  
17 como LAAS, CEI, LAC, ODE e UDE (ADAMS et al., 1993).

18 A avaliação do estado de incapacidade funcional foi realizada pela escala  
19 de Rankin modificada (mRS) (BONITA; BEAGLEHOLE, 1988) aplicada em até oito horas  
20 da admissão no hospital (*baseline*) e os valores foram categorizados em  
21 comprometimento funcional leve (mRS <3) e comprometimento funcional  
22 moderado/grave (mRS ≥3), como descrito previamente (ALFIERI et al., 2017). Os  
23 pacientes foram prospectivamente acompanhados após três meses do evento  
24 isquêmico, por meio de consulta ambulatorial ou entrevista telefônica com o paciente  
25 ou o mais próximo dele ou responsável, quando apropriado (OH et al., 2011). Neste  
26 momento, foram coletados dados sobre os cuidados médicos recebidos durante o  
27 período de seguimento, o estado funcional após o AVEi ou a mortalidade, de acordo  
28 com o instrumento descrito no Apêndice 1C. No caso de óbito, o avaliador solicitava a  
29 data do mesmo e se foi em decorrência do AVEi ou por outra causa não relacionada ao  
30 aevento isquêmico. Os pacientes com AVEi foram categorizados como bom (mRS <3) ou  
31 pior desfecho (mRS ≥3) (PARK et al., 2015).

1 O grupo controle foi composto de 176 indivíduos selecionados entre  
2 candidatos a doadores de sangue fidelizados do Hemocentro Regional de Londrina e  
3 indivíduos da população geral de Londrina. Além dos critérios de exclusão definidos  
4 para os pacientes, os indivíduos do grupo controle deveriam apresentar ausência de  
5 reatividade em todos os testes sorológicos realizados na triagem de doadores de  
6 sangue, como anticorpos contra o vírus da imunodeficiência humana (HIV) tipos 1 e 2,  
7 anticorpos contra o vírus da hepatite C (HCV), antígeno de superfície do vírus da  
8 hepatite B (HBV), anticorpos contra o antígeno *core* do HBV, anticorpos contra o vírus  
9 linfotrófico de células T humanas tipos I e II (HTLV I/II), anticorpos anti-*Trypanosoma*  
10 *cruzi* e teste não treponêmico para sífilis.

11 Foram coletados dados demográficos (idade, sexo e etnia),  
12 epidemiológicos como fatores de risco associados ao AVEi (hipertensão, sedentarismo,  
13 tabagismo, dislipidemia e DM), antropométricos (peso, altura e IMC) e clínicos como  
14 pressão sanguínea sistólica (PAS), pressão sanguínea diastólica (PAD) e medicamentos  
15 em uso no período que antecedeu o evento isquêmico. As medidas antropométricas  
16 avaliadas foram peso corporal (kg) e altura (m), obtidas, por interrogatório, durante a  
17 aplicação do questionário. O IMC foi calculado como peso (kg) dividido pela altura (m)  
18 ao quadrado e expresso em kg/m<sup>2</sup>.

19 PAD e PAS foram obtidas no período da admissão pelo uso de aparelho  
20 digital devidamente calibrado e expressas em mmHg. PAS ≥130 mmHg e PAD ≥90  
21 mmHg ou uso de anti-hipertensivo foram os critérios considerados para definir  
22 hipertensão (JAMES et al., 2014). Presença de DM foi definida como glicose em jejum  
23 ≥126 mg/dL e não-jejum ≥200 mg/dL e/ou o uso de medicamentos antidiabéticos  
24 (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014). Dislipidemia foi definida pela presença de  
25 uma ou mais das concentrações anormais de lipídeos no soro, como CT ≥200 mg/dL,  
26 LDL ≥130 mg/dL; HDL <40 mg/dL (NATIONAL CHOLESTEROL EDUCATION PROGRAM,  
27 2002).

28 Os dados foram coletados pela aplicação de um questionário padrão  
29 (Apêndice 1C), respondidos pelo paciente ou por seus responsáveis e pelo grupo  
30 controle. Os dados foram, também, obtidos por meio de consulta aos prontuários  
31 médicos e à base de dados LABHOS do Laboratório de Análises Clínicas (LAC) do  
32 HU/UEL

## 1 4.6 EXAMES LABORATORIAIS

2

3 Amostras de sangue periférico, com e sem condições de jejum para os  
4 pacientes e jejum para o grupo controle, foram coletadas nas primeiras 24 horas da  
5 admissão no hospital pelos participantes do projeto, segundo a requisição de exames  
6 laboratoriais padronizada pelo hospital. Foram coletados 10 mL em tubo de coleta a  
7 vácuo sem anticoagulante e dois tubos de 10 mL com anticoagulante EDTA e fluoreto.  
8 O material foi encaminhado imediatamente ao laboratório para registro,  
9 processamento e armazenamento das amostras. Plasma, soro e *buffy coat* foram  
10 obtidos após centrifugação (10 min 2500 rpm) e armazenados a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  até o momento  
11 das análises quando as amostras não eram analisadas no mesmo dia. Todos os  
12 pacientes e controles e suas respectivas amostras foram identificados por número e  
13 letra para garantir o anonimato e confidencialidade dos indivíduos e dos resultados  
14 obtidos.

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

20

### 21 4.6.1 Marcadores Inflamatórios, metabólicos e de estresse oxidativo

22

23 Os exames de contagem total de leucócitos periféricos (células/mm<sup>3</sup>),  
24 contagem de plaquetas (células/mm<sup>3</sup>) e VHS (mm/1ªhora) foram determinados por  
25 meio de autoanalisadores Mindray BC6800 e Alifax test 1, respectivamente; a dosagem  
26 dos níveis plasmáticos de citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 foram realizadas por método  
27 imunoenzimático (ELISA, *eBioscience, San Diego, Califórnia, USA*), com limite de  
28 detecção de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 definido como 2,0 ng/mL, 1,0 ng/mL e 2,0 ng/mL  
29 respectivamente, de acordo com o fabricante.

30

31 Os níveis séricos de usPCR foram avaliados imunoensaio de micropartícula  
32 com quimioluminescência (*Architech™, Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA*), com  
sensibilidade analítica de 0,175 mg/L. Os resultados foram categorizados em  $< 3\text{ mg/L}$

1 e  $\geq 3$  mg/L para análise estatística (RIDKER, 2003). Os níveis séricos de ferritina,  
2 25(OH)D e homocisteína foram determinados por imunoensaio de quimiluminescência  
3 por micropartículas (*Architech™, Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA*). Os níveis de  
4 ferro foram determinados por autoanalisador bioquímico (*Dimension Dade AR Dade*  
5 *Behring, Deerfield, IL, USA*), utilizando kits Dade Behring®.

6 Os níveis de ácido úrico, glicose, CT, HDL, LDL e triglicerídeos foram  
7 determinados por autoanalisador bioquímico (*Dimension Dade AR Dade Behring,*  
8 *Deerfield, IL, EUA*), utilizando kits Dade Behring®. Os níveis de insulina foram avaliados  
9 por imunoensaio em micropartícula com quimiluminescência (*Architech™, Abbott*  
10 *Laboratory, Abbott Park, IL, USA*).

11 A avaliação da formação de hidroperóxidos lipídicos foi realizada por  
12 quimioluminescência segundo uma adaptação da técnica descrita anteriormente  
13 (GONZALEZ FLECHA; LLESUY; BOVERIS, 1991). Os níveis de NOx foram determinados no  
14 plasma por espectrofotometria de acordo com a reação de Griess (NAVARRO-  
15 GONZALVEZ; GARCIA-BENAYAS; ARENAS, 1998), com algumas modificações. Esta  
16 técnica utiliza o grânulo de cádmio para reduzir nitrato a nitrito, o qual é quantificado  
17 ao formar um complexo colorido com reagente de Griess. Os resultados foram  
18 expressos em  $\mu\text{M}$ .

19

#### 20 4.7. POLIMORFISMO NO GENE DA PROTEÍNA C-REATIVA (RS1130864)

21

##### 22 4.7.1 Extração do DNA

23

24 A extração do DNA genômico a partir do *buffy-coat* de ambos os grupos foi  
25 realizada utilizando o método de separação em coluna com reagentes comercialmente  
26 disponíveis (*Biopur, Biometrix Diagnóstica, Curitiba, PR, Brasil*), segundo as instruções  
27 do fabricante. A integridade do DNA extraído foi analisada por eletroforese em gel de  
28 agarose 1%, aplicando-se 5  $\mu\text{L}$  da amostra de DNA extraído e 5  $\mu\text{L}$  do corante xileno  
29 cianol (X-C). A eletroforese foi realizada a 100 V, em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE)  
30 1x (*Gibco™, Invitrogen Corporation, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA*). Após a  
31 corrida de 45-60 minutos, o gel foi submerso em uma cuba com tampão TAE 1x  
32 (*Gibco™, Invitrogen Corporation, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA*) contendo

1 brometo de etídio (20 mg/mL) por 20 minutos e a imagem do gel foi capturada e  
2 armazenada pelo sistema de fotodocumentação L-PIX-HE (*Locus Biotecnologia, Cotia,*  
3 *SP, Brasil*). Em cada eletroforese realizada, foi incluído um controle de DNA, com  
4 concentração de 100 ng/ $\mu$ L, para análise comparativa com o DNA das amostras do  
5 estudo.

6

#### 7 4.7.2. Reação em Cadeia da Polimerase para o Polimorfismo rs1130864

8

9 Aproximadamente 100 ng de DNA foram utilizados para amplificar uma  
10 sequência de 460 pares de base (pb) do gene *PCR* utilizando a reação em cadeia da  
11 polimerase (PCR) seguindo os protocolos descritos na literatura, com algumas  
12 modificações (YAN et al., 2007). Os *primers* utilizados para a amplificação do  
13 fragmento de 460pb do gene *PCR* foram sintetizados de acordo com a sequência do  
14 *GenBank* número M11880.1 (Quadro 1).

15 A reação de PCR foi realizada em um volume final de 25 $\mu$ L, contendo 0,15  
16 mM de cada *primer*, 1,50 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,10 mM de dNTP (*Invitrogen™, Life*  
17 *Technologies, Carlsbad, CA, USA*), 1,25 U da enzima DNA polimerase recombinante  
18 diluída em seu tampão (*Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA*) e 100 ng da  
19 amostra de DNA. A PCR foi realizada em termociclador (*Applied Biosystems Veriti™ 96-*  
20 *well Thermal Cycler, Life Technologies, Foster City, CA, USA*), com um ciclo de  
21 desnaturação inicial de 5 minutos a 95°C; seguido por 37 ciclos de 45 segundos a 95°C  
22 para desnaturação, 45 segundos a 56°C para o anelamento e 45 segundos a 72°C para  
23 extensão; e 10 minutos a 72°C para a extensão final. Todas as reações foram realizadas  
24 com um controle negativo (ausência de DNA) para assegurar a não contaminação com  
25 ácidos nucleicos.

26

27

28

29

30

31

32

1 **Quadro 1** Sequência do gene *PCR* com 2.438 pares de base obtida pela consulta ao  
 2 *GenBank* número M11880.1. Em destaque, a sequência amplificada para o  
 3 polimorfismo rs1130864

4	1	aataaataac	tcacattgat	ttctctggtc	tgaataaatt	ttgcttcccc	tcttcccgaa
5	61	gctctgacac	ctgcccac	aagcaatggt	ggaaaattat	ttacatagtg	gcgcaaactc
6	121	ccttactgct	ttggatataa	atccaggcag	gaggaggtag	ctctaaggca	agagatctag
7	181	gacttctagc	cctgaactt	tcagccgaat	acatcttttc	caaaggagtg	aattcaggcc
8	241	cttgatcac	tggcagcag	acgtgacat	ggagaagctg	ttgtgtttct	tggtcttgac
9	301	cagcctctct	catgcttttg	gccagacagg	taagggccac	cccaggctat	gggagagttt
10	361	tgatctgagg	tatgggggtg	gggtctaaga	ctgcatgaac	agtctcaaaa	aaaaaaaaaa
11	421	aagactgtat	gaacagaaca	gtggagcatc	cttcatgggtg	tgtgtgtgtg	tgtgtgtgtg
12	481	tgtgtgtggt	gtgtaactgg	agaaggggtc	agtctgtttc	tcaatcttaa	attctatacg
13	541	taagtgaggg	gatagatctg	tgtgatctga	gaaacctctc	acatttgctt	gtttttctgg
14	601	ctcacagaca	tgtcgaggaa	ggcttttttg	tttcccaaag	agtcggatac	ttcctatgta
15	661	tcctcaaaag	caccgttaac	gaagcctctc	aaagccttca	ctgtgtgcct	ccacttctac
16	721	acggaactgt	cctcgaccog	tgggtacagt	attttctcgt	atgccaccaa	gagacaagac
17	781	aatgagattc	tcatattttg	gtctaaggat	ataggataca	gttttacagt	gggtgggtct
18	841	gaaatattat	tcgaggttcc	tgaagtcaca	gtagctccag	tacacatttg	tacaagctgg
19	901	gagtccgctt	cagggatcgt	ggagtctctg	gtagatggga	agcccagggt	gaggaagagt
20	961	ctgaagaagg	gatacactgt	gggggcagaa	gcaagcatca	tcttggggca	ggagcaggat
21	1021	tccttcgggtg	ggaactttga	aggaagccag	tccttagtgg	gagacattgg	aaatgtgaac
22	1081	atgtgggact	ttgtgtctgc	accagatgag	attaacacca	tctatcttgg	cggtcccttc
23	1141	agtccctaagt	tccctgaactg	gcgggactg	aagtatgaag	tgaaggcga	agtgttcacc
24	1201	aaaccccagc	tgtggccctg	agcccagct	gtgggtcctg	aaggtacctc	ccggtttttt
25	1261	acaccgcatg	ggcccacagt	ctctgtctct	ggtacctccc	gctttttttac	actgcatggt
26	1321	tcccacgtct	ctgtctctgg	gcctttgttc	ccctatatgc	attgaggcct	gctccaccct
27	1381	cctcagcgcc	tgagaatgga	ggtaaagtgt	ctggctctgg	agctcgtaa	ctatgctggg
28	1441	aaatgggtcca	aaagaatcag	aatttgaggt	gttttgttt	catttttatt	tcaagttgga
29	1501	cagatcttgg	agataatttc	ttacctcaca	tagatgagaa	aactaacacc	cagaaaggag
30	1561	aatgatggtt	ataaaaact	cataaggcaa	gagctgagaa	ggaagcgtg	atcttctatt
31	1621	taattcccca	ccatgaccc	ccagaaagca	ggagcattgc	ccacattcac	agggtctctc
32	1681	agtatcagaa	tcaggacact	ggccaggtgt	ctggtttggg	tccagagtgc	tcatcatcat
33	1741	gtcatagaac	tgctgggccc	aggtctcctg	aaatgggaag	cccagcaata	ccacgcagtc
34	1801	cctccacttt	ctcaaagcac	actggaagg	ccattagaat	tgcccagca	gagcagatct
35	1861	gctttttttc	cagagcaaaa	tgaagcacta	ggtataaata	tgttgttact	gccaagaact
36	1921	taaagtactg	gtttttgttt	gcttgacgtg	ctttcttaat	tttatggctc	ttctgggaaa
37	1981	ctcctcccct	tttccacacg	aaccttggtg	ggctgtgaat	tctttcttca	tccccgatt
38	2041	cccaatatac	ccaggccaca	agagtggacg	tgaaccacag	ggtgtcctgt	cagaggagcc
39	2101	catctcccat	ctcccagct	ccctatctgg	aggatagttg	gataggtacg	tgttcttagc
40	2161	aggaccaact	acagtcttcc	caaggattga	gttatggact	ttgggagtga	gacatcttct
41	2221	tgctgctgga	tttccaagct	gagaggacgt	gaacctggga	ccaccagtag	ccatcttgtt
42	2281	tgccacatgg	agagagactg	tgaggacaga	agccaaactg	gaagtggagg	agccaaggga
43	2341	ttgacaaaaca	acagagcctt	gaccacgtgg	agtctctgaa	tcagccttgt	ctggaaccag
44	2401	atctacacct	ggactgccc	ggtctataag	ccaataaa		

45 Em verde estão: *Primer PCR+1444 (sense): 5'-CCCTTCAGTCCTAATGTCC-3'* e *Primer PCR+1444*  
 46 *(antisense): 5'-GCTCTTGCCTTATGAGTTTT-3'* (*Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA*). Em azul:  
 47 sítio de restrição polimórfico para a enzima *HpyCH4III (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA)* no gene  
 48 da Proteína C-reativa. Em amarelo: alelo polimórfico. Fonte: adaptado de  
 49 [www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/term=M11880.1](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/term=M11880.1).

50

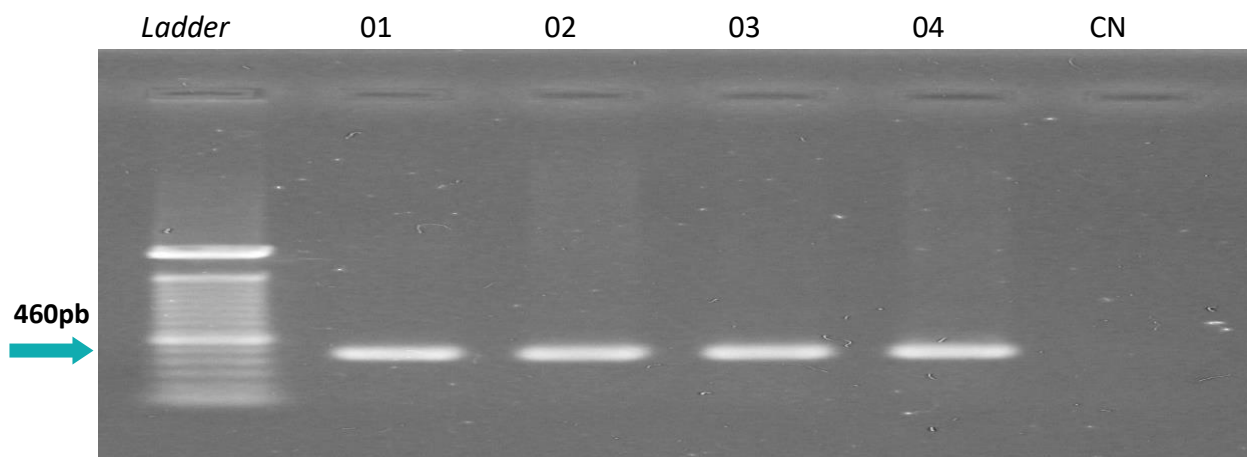
51 Para a análise da amplificação do gene *PCR*, 5 µL do produto obtido na PCR  
 52 e 5 µL do corante X-C foram aplicados em gel de agarose 1%, realizada a corrida de 20

1 minutos (100 V) com posterior coloração do gel com brometo de etídeo e  
2 fotodocumentação no sistema L-PIX-HE (*Locus Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil*). Em  
3 cada eletroforese foi aplicado, também, 4  $\mu\text{L}$  do marcador (*ladder*) de 100pb  
4 (*Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA*) e 5  $\mu\text{L}$  do corante X-C para  
5 determinar o tamanho do fragmento de DNA amplificado. Como se observa na Figura  
6 6, todas as amostras apresentaram amplificação na região correspondente a 460pb,  
7 indicando a amplificação do fragmento estudado

8

9 **Figura 6** Análise dos produtos da reação em cadeia da polimerase a partir de  
10 *primers* específicos para o polimorfismo rs1130864 no gene *PCR*.

11



12

13 Eletroforese em gel de agarose 1% após coloração com brometo de etídeo para a visualização dos  
14 produtos de amplificação do fragmento específico com 460 pares de base. *Ladder* de DNA com  
15 100pb; 1 a 4 (amostras de DNA de doadores de sangue inseridos no estudo); CN: Controle Negativo  
16 ou *blank* (ausência de DNA).

17

18 4.7.3 Polimorfismos do comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP) para o  
19 rs1130864

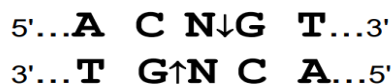
20

21 O protocolo de reação de RFPL utilizado foi previamente descrito na  
22 literatura (YAN et al., 2007), com algumas modificações. Brevemente, dez microlitros  
23 do produto da PCR foi completamente digerido com 0,3  $\mu\text{L}$  de enzima *HpyCH4III* 5U/ $\mu\text{L}$   
24 (*New England BioLabs, Ipswich, MA, USA*) por 4 horas a 37°C em termobloco.

1 A enzima de restrição *HpyCH4III* (*New England BioLabs, Ipswich, MA, USA*) é  
 2 purificada de *Helicobacter pylori* CH4 e tem como sítio de restrição a sequência de  
 3 nucleotídeos mostrada na Figura 7.

4

5 **Figura 7** Sequência de nucleotídeos que conferem o sítio de restrição para a  
 6 enzima *HpyCH4III*.



7

8 A: adenina; C: citosina; T: timina; G: guanina; N: qualquer nucleotídeo.

9

10 A troca de bases (C→T) na sequência do gene *PCR* elimina o sítio de  
 11 restrição para a enzima *HpyCH4III* (*New England BioLabs, Ipswich, MA, USA*).  
 12 Conseqüentemente, o alelo que contém em sua sequência a base C apresenta o sítio  
 13 de restrição para a enzima, enquanto que o alelo que possui a base T perde esse sítio  
 14 de restrição

15 Os produtos da digestão enzimática foram analisados por eletroforese em  
 16 gel de agarose 3%, aplicando-se 10 µL do produto de digestão enzimática de cada  
 17 amostra e 5 µL de corante X-C no gel para a visualização dos fragmentos formados. A  
 18 eletroforese foi realizada a 70 V durante 80-90 minutos e o gel corado com brometo  
 19 de etídeo conforme descrito anteriormente. Os fragmentos foram visualizados e  
 20 identificados e a imagem do gel foi capturada e armazenada pelo sistema de  
 21 fotodocumentação L-PIX-HE (*Locus Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil*). A análise das  
 22 bandas eletroforéticas permitiu a caracterização dos três possíveis genótipos do  
 23 polimorfismo rs1130864.

24 Esse polimorfismo apresenta em sua sequência um único sítio polimórfico  
 25 de restrição para a enzima, que somente será clivado quando não houver a troca da  
 26 base C pela T. Com isso, o alelo C sempre será clivado devido à presença do sítio  
 27 polimórfico, formando dois fragmentos de tamanhos diferentes. O alelo T não sofre a  
 28 ação da enzima, pois não apresenta o sítio para clivagem (ocorre a perda do sítio

1 polimórfico), com a formação de um único fragmento. Portanto, os três genótipos  
 2 possíveis foram identificados da seguinte maneira:

- 3 • CC representa o genótipo na ausência de mutação e apresenta dois  
 4 fragmentos, com 149pb e 311pb (provenientes da clivagem do sítio  
 5 polimórfico).
- 6 • CT representa o genótipo com mutação em heterozigose, contendo três  
 7 fragmentos, com 149pb e 311pb (provenientes da clivagem do sítio  
 8 polimórfico presente no alelo C) e 460pb (proveniente do alelo T que não  
 9 sofre a ação da enzima).
- 10 • TT representa o genótipo com mutação em homozigose, apresentando  
 11 somente um fragmento com 460pb (que não sofre a ação da enzima).

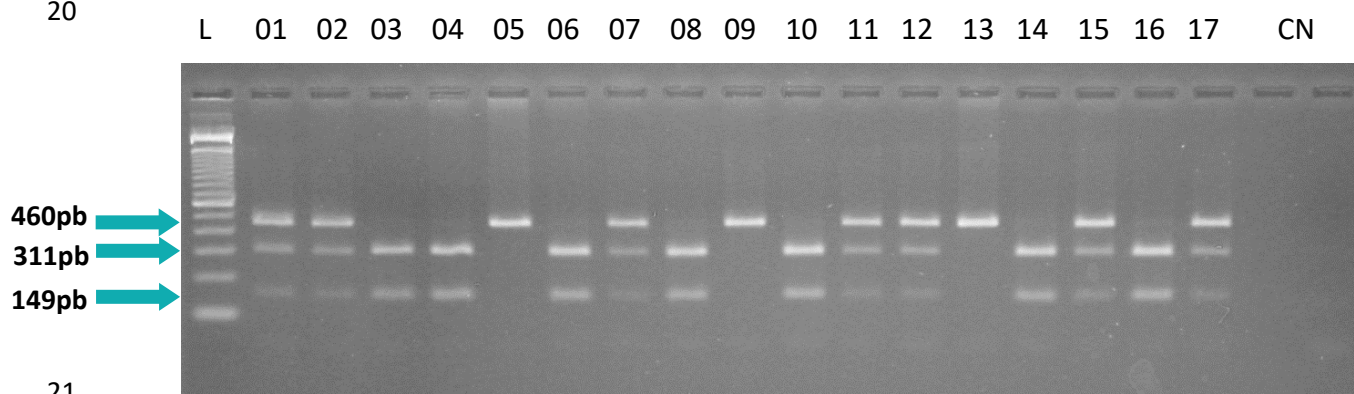
12

13 A Figura 8 apresenta os resultados obtidos pela eletroforese em gel de  
 14 agarose 3% após coloração com brometo de etídeo. A análise eletroforética dos  
 15 produtos de digestão enzimática possibilitou a caracterização dos genótipos  
 16 encontrados na população em estudo.

17

18 **Figura 8** Análise dos produtos da digestão enzimática em 17 amostras de  
 19 pacientes

20



21

22 Eletroforese em gel de agarose 3% após coloração com brometo de etídeo caracterizando os três  
 23 perfis genéticos após a digestão com a enzima de restrição *HpyCH4III*. L: *ladder* de DNA com 100pb;  
 24 amostras 01, 02, 07, 11, 12, 15 e 17: genótipo CT com mutação em heterozigose (presença de três  
 25 fragmentos com 149, 311 e 460pb); amostras 03, 04, 06, 08, 10, 14 e 16: genótipo CC na ausência de  
 26 mutação (presença de dois fragmentos com 149 e 311pb); amostras 05, 09 e 13: genótipo

1       homozigoto TT com mutação em homozigose (presença de um único fragmento com 460pb); CN:  
2       Controle Negativo.

#### 4   4.7       ANÁLISE ESTATÍSTICA

5  
6       As análises de contingência (teste  $\chi^2$  ou Exato de Fisher) foram utilizadas  
7       para verificar as associações entre as variáveis categóricas e grupos de diagnóstico.  
8       Foram avaliadas as diferenças das variáveis contínuas entre os grupos utilizando  
9       análises de variância (ANOVA) e teste de Mann-Whitney quando não houve  
10       normalidade em ambos os grupos. As variáveis categóricas foram expressas em  
11       número absoluto (n) e o percentual (%), e as variáveis contínuas foram expressas como  
12       média  $\pm$  e erro padrão da média (EPM) ou mediana e intervalo interquartil (25-75%),  
13       quando apropriado.

14       Para o primeiro artigo científico, a análise multivariada do modelo linear  
15       geral (GLM) foi utilizada para avaliar os efeitos multivariados das variáveis preditoras  
16       (por exemplo, AVEi, idade, sexo, tabagismo, diabetes, IMC, hipertensão, dislipidemia e  
17       uso de medicamentos) em biomarcadores inflamatórios, metabólicos e de EROS e  
18       ERNS como variáveis dependentes. Quando os testes multivariados foram  
19       significativos, usamos testes para efeitos entre os sujeitos para delinear os efeitos  
20       univariados das variáveis explicativas. Assim, não usamos correções de p para  
21       interpretar os dados de biomarcadores inflamatórios, metabólicos e de EROS e ERNS  
22       porque os testes univariados (protegidos) são realizados apenas se os efeitos  
23       multivariados forem significativos. Análise de regressão logística binária automática  
24       *stepwise* foi empregada para delinear os biomarcadores mais significativos que estão  
25       associados com AVEi. Além disso, a análise de regressão *stepwise* foi utilizada para  
26       avaliar os biomarcadores demográficos/clínicos e inflamatórios mais significativos que  
27       predizem a mRS após três meses de acompanhamento (dados transformados em  
28       logaritmo).

29       No segundo artigo científico, após a análise univariada, para identificar os  
30       fatores de risco para AVEi, foi aplicada regressão logística binária para avaliar quais  
31       fatores estavam independentemente associados com o AVEi. A análise de regressão  
32       automática *stepwise* foi empregada para avaliar os biomarcadores demográficos/

1 clínicos e inflamatórios mais significativos que predizem a mRS após três meses de  
2 acompanhamento de acordo com o polimorfismo (dados logaritmo natural  
3 transformado).

4 A análise estatística foi realizada com SPSS para Windows, versão 22.0  
5 (SPSS Inc., CHIGADO, IL, EUA) e a significância estatística foi definida como  $p < 0,05$ .

1 **5. RESULTADOS**

2

3 Os resultados obtidos neste trabalho foram apresentados e discutidos em  
4 dois artigos científicos:

5

6 • Immune-inflammatory, metabolic, oxidative and nitrosative stress set of  
7 biomarkers predicts acute ischemic stroke and short-term outcome. Submetido  
8 na revista ***Neuromolecular Medicine***, ISSN: 1535-1084, Fator de impacto 2,952,  
9 classificação Qualis CAPES A2.

10

11 • Association between 3'untranslated region variation (rs1130864) in *CRP* gene  
12 and short-term outcome in ischemic stroke patients. Submetido na revista  
13 ***Neurological Research***, ISSN: 0161-6412, Fator de impacto 1,440, Qualis CAPES  
14 B2.

15

1 **IMMUNE-INFLAMMATORY, METABOLIC, OXIDATIVE AND NITROSATIVE STRESS SET**  
2 **OF BIOMARKERS PREDICTS ACUTE ISCHEMIC STROKE AND SHORT-TERM OUTCOME**

3

4 Daniela Frizon Alfieri<sup>a</sup>, Marcio Francisco Lehmann<sup>b</sup>, Tamires Flauzino<sup>a</sup>, Maria Caroline  
5 Martins de Araújo<sup>c</sup>, Nicolas Pivoto<sup>d</sup>, Rafaelle Maria Tirola<sup>e</sup>, Andrea Name Colado Simão<sup>a,f</sup>,  
6 Michael Maes<sup>g</sup>, Edna Maria Vissoci Reiche<sup>a,f</sup>

7

8 a: Laboratory of Research in Applied Immunology, Health Sciences Center, State  
9 University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil;

10 b: Department of Clinical Surgery, Health Sciences Center, and Neurosurgery Service of  
11 the University Hospital, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil;

12 c: Neurology Postgraduate Program, University Hospital of State University of Londrina,  
13 Paraná, Brazil;

14 d: Graduate Medicine School, Health Sciences Center, State University of Londrina,  
15 Paraná, Brazil;

16 e: Pharmacy School, Health Sciences Center, State University of Londrina, Londrina,  
17 Paraná, Brazil;

18 f: Department of Pathology, Clinical Analysis, and Toxicology, Health Sciences Center,  
19 State University of Londrina, Paraná, Brazil;

20 g: IMPACT Strategic Research Centre, School of Medicine, Deakin University, Geelong,  
21 Victoria, Australia.

22

23 **Address for correspondence:** Edna Maria Vissoci Reiche, Department of Pathology,  
24 Clinical Analysis and Toxicology, Health Sciences Center, Londrina State University, Av.  
25 Robert Koch, 60, CEP 86.038-440, Londrina, Paraná, Brazil. Phone/FAX number: +55-43-  
26 3371-2619. e-mail: reiche@sercomtel.com.br  
27 ORCID: 0000-0001/6507-2839.

28

29

30

31

32

**1 ABSTRACT**

2

3 Inflammatory, metabolic, oxidative and nitrosative (IMO&NS) pathways have an  
4 important role during acute ischemic stroke (AIS). The main objective of this study was  
5 to identify biomarkers to the early prediction of AIS and short-term outcome. A case-  
6 control study was conducted in 176 patients with AIS and 176 healthy controls.  
7 Modified Rankin Scale (mRS) was applied up to eight hours of AIS (baseline) and after  
8 three-month follow-up, and blood samples were obtained up to 24 hours of AIS to  
9 IMO&NS biomarkers evaluation. All results were adjusted for possible effects of all  
10 those variables as additional factors or covariates in multivariate analyses. General  
11 linear models (GLM) with all IMO&NS with demographic/clinical data showed the best  
12 set of predictors for AIS were sex (male), systolic blood pressure, glucose, nitric oxide  
13 metabolites, hydroperoxides, interleukin (IL)-6 and white blood cells (WBC) (all  
14 positively associated), and 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D] (inversely correlated)  
15 ( $p < 0.001$ ). Moreover, 89.4% of all AIS patients were correctly classified with 86.2%  
16 sensitivity and 93.0% specificity. At admission, the values of ferritin, IL-6, C-reactive  
17 protein evaluated with high sensitivity assay (hsCRP), WBC, erythrocyte sedimentation  
18 rate (ESR) and glucose were higher among those with baseline functional disability  
19  $mRS \geq 3$  ( $p < 0.001$ ). Moreover, the values of ferritin, IL-6, hsCRP, ESR, and glucose levels  
20 were higher and 25(OH)D levels were lower among those with functional disability  
21  $mRS \geq 3$  at short-term outcome ( $p < 0.001$ ). These results suggest that a set of IMO&NS  
22 biomarkers may be useful for the early prediction of AIS and short-term outcome.

23

24 **KEYWORDS:** Ischemic stroke; inflammatory biomarkers; oxidative stress; modified  
25 Rankin Scale, short-term outcome

26

27

28

29

30

31

## 1 INTRODUCTION

2 Acute ischemic stroke (AIS) is defined as a sudden loss of brain function  
3 resulting from severe interference in the flow of blood and oxygen in cerebral arteries.  
4 It has a heterogeneous etiology caused by unmodifiable risk factors, such as genetics,  
5 age, and sex, as well as by modifiable risk factors including hypertension, diabetes  
6 mellitus (DM), dyslipidemia, and smoking [1]. Data from the Global Burden of Disease  
7 (GBD) have demonstrated the increase in the burden of stroke worldwide in the last 25  
8 years, especially in developing countries [2]. In 2013, stroke was the second most  
9 common cause of death (11.8%) and the third most common cause of disability in the  
10 world [2].

11 Cerebral ischemia triggers a series of metabolites and inflammatory events,  
12 including the infiltration of circulating immune cells, activation of microglia, astrocytes  
13 and endothelial cell, and upregulating pro-inflammatory proteins [3]. Furthermore,  
14 ischemia and reperfusion have been shown to be associated with free radical-  
15 mediated reactions potentially leading to neuronal death [4].

16 At this moment, the diagnosis of AIS is made on clinical assessment and  
17 neuroimaging. Biomarkers can help to confirm the diagnosis and predict the prognosis  
18 for ischemic stroke. Inflammatory, metabolic, oxidative and nitrosative stress  
19 (IMO&NS) pathways have been implicated in the pathophysiology of stroke and key  
20 molecules of these different pathways have been evaluated as biomarkers for ischemic  
21 stroke diagnosis and prognosis in different population worldwide.

22 The most known risk factors for stroke are hypertension, dyslipidemia, DM, and  
23 smoking [1]. Increase systolic and diastolic blood pressure, high levels of triglycerides  
24 (TG), low-density lipoprotein (LDL) cholesterol, and glucose, whereas low levels of  
25 high-density lipoprotein (HDL)-cholesterol are metabolic biomarkers widely described  
26 in AIS [1].

27 Inflammatory biomarkers, such as C-reactive protein (CRP), interleukin (IL)-6,  
28 white blood cells (WBC), erythrocyte sedimentation rate (ESR), ferritin, and vitamin D,  
29 in addition to the oxidative stress biomarkers, such as oxide nitric metabolites (NOx)  
30 and products of lipid peroxidation as hydroperoxides have been reported as a  
31 predictable biomarkers for the AIS; moreover, some of these biomarkers have been  
32 associated with prognosis and recurrent AIS [5–13].

1           However, there have been discrepancies in the results evaluating the  
2 association of IMO&NS markers with AIS in various ethnic groups [14]. One of the  
3 reasons for the conflicting results may be the extent genetic variability for the  
4 molecules involved in the inflammation and metabolism pathways [15, 16].

5           To the best of our knowledge, no studies have investigated an association  
6 between a set of IMO&NS biomarkers in AIS patients. Therefore, the aim of the  
7 present study was to identify IMO&NS biomarkers that could be useful to the early  
8 prediction of AIS, as well as to predict the functional neurological impairment on  
9 admission and short-term outcome.

## 11 **MATERIALS AND METHODS**

### 12 **Study subjects**

13           The protocol was approved by the Institutional Research Ethic Committee of  
14 the State University of Londrina, Paraná State, Brazil (CAAE 0250.0.268.000-11) and a  
15 written consent form was obtained from all of the individuals. A total of 176 AIS  
16 patients diagnosed with focal neurological signs or symptoms thought to be of vascular  
17 origin that persisted for >24 h, confirmed by brain computed tomography (CT) and  
18 clinical examination in baseline conditions were consecutively recruited during January  
19 2013-2015 from the Emergency Room of the University Hospital of State University of  
20 Londrina.

21           The functional impairment was evaluated using the modified Rankin Scale  
22 (mRS) [17] applied within the first 8h of admission (baseline) and the values were used  
23 to categorize the patients as mild functional impairment (mRS <3) and  
24 moderate/severe functional impairment (mRS ≥3). The mRS was also applied after  
25 three-month follow-up through clinical examination or using telephone interviews  
26 with the patients or their relatives [18] and the values were used to categorize the  
27 patients as good outcome (mRS <3) and poor outcome (mRS ≥3) [19]. All the patients  
28 were managed using a standardized protocol adapted from international guidelines for  
29 managing AIS. As controls, 176 individuals from general population of Londrina were  
30 enrolled in the same period, with no history of stroke/ myocardial infarction.

31           Exclusion criteria for patients and controls were recent history of fever within  
32 last seven days prior to onset of stroke symptoms, acute inflammatory diseases,

1 hemorrhagic stroke, acute transient ischemic attack (AIT); chronic and acute infections,  
2 such as human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1), hepatitis B and C infections,  
3 autoimmune diseases; renal or liver failure, history of myocardial infarction, surgery  
4 within last 30 days, angiography within last seven days, trauma within last 30 days,  
5 malignancies, steroid or non-steroidal anti-inflammatory therapies and  
6 immunosuppressive drugs use.

7

### 8 **Demographic, epidemiological, anthropometric and clinical data**

9 Demographic, epidemiological, anthropometric, and clinical data with  
10 traditional stroke risk factors and the use of any therapeutic drugs before the inclusion  
11 in this study were obtained using a standard questionnaire at the admission of the  
12 individuals. The anthropometric measures were verified by body weight and height  
13 reported by the individuals, when it was possible, or by the patient's family. Body mass  
14 index (BMI) was calculated as weight (kg) divided by height (m) squared. The ethnicity  
15 was self-reported as Caucasian and non-Caucasian (Asiatic, Black, and Afro-Brazilian)  
16 [20]. Baseline blood pressure evaluations were obtained at the admission of the  
17 individuals in the study (patients and controls) using digital apparatus properly  
18 calibrated, and the mean of these measurements was used in the analysis. Use of  
19 antihypertensive medication was an indication of hypertension [21]; type 2 DM  
20 (T2DM) was defined as a fasting serum glucose  $\geq 126$  mg/dL, a non-fasting serum  
21 glucose  $\geq 200$  mg/dL and/or use of anti-diabetic medication [22]; dyslipidemia was  
22 defined by the presence of one or more than one of the abnormal serum lipid  
23 concentration: total cholesterol (TC)  $\geq 200$  mg/dL, LDL-cholesterol  $\geq 130$  mg/dL; HDL-  
24 cholesterol  $< 40$  mg/dL, TG  $> 150$  mg/dL [23].

25

### 26 **Inflammatory, metabolic, oxidative and nitrosative stress biomarkers**

27 Peripheral blood samples were obtained under non-fasting state, without and  
28 with anticoagulant. From the stroke patients, the samples were obtained at the  
29 hospital admission (max 24h); from controls, the samples were obtained at study  
30 admission. Plasma and serum samples were immediately separated by centrifugation  
31 (2,500 rpm for 15 min) and stored in aliquots at  $-80$  °C until analyzes.

1 As inflammatory biomarkers, plasma levels of IL-6 were evaluated using a  
2 sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA, eBioscience, San Diego,  
3 California, USA); WBC and ESR were determined using hematological autoanalyzers;  
4 serum levels of CRP were determined with high sensitivity method (hsCRP); ferritin,  
5 and hydroxyvitamin D [25(OH)D] were determined using chemiluminescent  
6 microparticle assay (CMIA, Architect, Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA). Among  
7 the metabolic biomarkers, the study included glucose, TC, HDL- cholesterol, LDL-  
8 cholesterol, TG, uric acid, and iron levels that were evaluated using a biochemical auto-  
9 analyzer (Dimension Dade AR Dade Behring, Deerfield, IL, USA); insulin and  
10 homocysteine levels were determined using chemiluminescent microparticle  
11 immunoassay (CMIA, Architect, Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA). All the  
12 laboratory analysis were performed according to the manufacturer's instructions and  
13 their reference values.

14 Regarding the oxidative and nitrosative stress biomarkers, lipid hydroperoxides  
15 were evaluated by tert-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescent assay (CL-  
16 LOOH), as previously [24] and the results were expressed in counts per minute (cpm).  
17 Plasma levels of nitric oxide (NO) were estimated by measuring the NO metabolites  
18 (NOx) nitrites ( $\text{NO}_2^-$ ) and nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ), according to the Griess reaction  
19 supplemented by the reduction of nitrate to nitrite with cadmium [25] and the results  
20 of nitrite were expressed in  $\mu\text{M}$ .

21

## 22 **Statistical Analysis**

23 Analyses of variance (ANOVA) were employed to assess between-group  
24 differences in continuous variables. Analyses of contingency tables ( $\chi^2$ -tests) were used  
25 to assess the associations between sets of categorical variables. Multivariate general  
26 linear model (GLM) analysis was employed to assess the multivariate effects of  
27 predictor variables (e.g. stroke, age, sex, smoking, diabetes, BMI, hypertension,  
28 dyslipidemia and use of medications) on IMO&NS and metabolic biomarkers as  
29 dependent variables. When multivariate tests were significant, we used tests for  
30 between-subject effects to delineate the univariate effects of the explanatory  
31 variables. Thus, we do not use p-corrections for interpreting the IMO&NS and  
32 metabolic biomarker data because the (protected) univariate tests are only carried out

1 if the multivariate effects are significant. Automatic stepwise binary logistic regression  
2 analysis was employed to delineate the most significant biomarkers that are associated  
3 with stroke. All statistical analyses were performed using IBM SPSS windows version  
4 22. Tests were 2-tailed and an alpha level of 0.05 indicated statistically significant  
5 results.

6

## 7 **RESULTS**

8 Table 1 shows the demographic, clinical and laboratory characteristics of AIS  
9 patients *versus* controls. Patients with AIS were somewhat older, more males as well  
10 as higher frequency of smoking, T2DM, hypertension, and use of hypoglycemic,  
11 hypolipemiant and antihypertensive medications than controls. However, there were  
12 no significant differences in BMI and ethnicity between both study groups. Therefore,  
13 we have adjusted all our results for possible effects of all those variables by entering  
14 the variables as additional factors or covariates in multivariate analyses. Moreover,  
15 patients with AIS have higher levels of NOx, hydroperoxides, ferritin, IL-6,  
16 homocysteine, hsCRP, WBC, SBP, DBP and ESR but lower 25(OH)D, iron, HDL and TC  
17 levels than control subjects. Table 1 also shows the model-generated estimated  
18 marginal mean (SE) values of the IMO&NS biomarkers obtained by the multivariate  
19 GLM analyses shown in Table 2. Phrased differently, here we present the values  
20 adjusted for sex, age, smoking, diabetes, BMI, and use of hypoglycemic and lipid  
21 lowering drugs.

22 In order to examine the association of AIS stroke with IMO&NS biomarkers, we  
23 have carried out multivariate GLM analyses with the biomarkers as dependent  
24 variables and the age, sex, BMI, and use of drugs data as covariates (Table 2). This  
25 table shows the outcome of two different multivariate GLM analyses, a first with the  
26 IMO&NS biomarkers, such as NOx, hydroperoxides, 25(OH)D, ferritin, iron, IL-6,  
27 homocysteine, hsCRP, WBC and ESR as dependent variables and AIS as explanatory  
28 variable with AIS, sex, age, T2DM, hypoglycemic, BMI and hypolipemiant drugs as  
29 additional covariates. We found that AIS had significant multivariate effects on the  
30 IMO&NS biomarkers after controlling for the background variables of which sex, age,  
31 T2DM, and use of hypoglycemic that were significant. Smoking, BMI, and use of  
32 hypolipemiant drugs had no significant multivariate effect. Tests for between-subject

1 effects show that AIS had significant univariate effects on NO<sub>x</sub>, hydroperoxides,  
2 25(OH)D, iron, IL-6, homocysteine, hsCRP, WBC, and ESR. We have additionally  
3 examined the effects of antihypertensive ( $F=0.69$ ,  $df=10/145$ ,  $p=0.737$ ), dyslipidemia  
4 ( $F=1.45$ ,  $df=10/146$ ,  $p=0.166$ ), hypertension ( $F=1.33$ ,  $df=10/146$ ,  $p=0.218$ ) and ethnicity  
5 ( $F=0.81$ ,  $df=10/145$ ,  $p=0.616$ ) but found that these variables do not have a significant  
6 multivariate effect on the IMO&NS biomarkers.

7         The second GLM analysis in Table 2 shows the all metabolic biomarkers (insulin,  
8 glucose, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, TC, TG, and uric acid) as well as SBP and DBP  
9 as dependent variables and AIS as explanatory variable together with sex, age,  
10 smoking, T2DM, hypoglycemic drugs, BMI, hypolipemiant, hypertension,  
11 antihypertensive and dyslipidemia as covariates. The results showed significant  
12 multivariate effects of AIS on the metabolic biomarkers after controlling for all  
13 additional background variables of which sex, age, T2DM, BMI, use of hypolipemiant,  
14 hypertension, and dyslipidemia that had significant multivariate effects. There were no  
15 significant effects for smoking, hypoglycemic and antihypertensive medications. Tests  
16 for between-subject effects (as well as Table 1) show that patients with AIS have  
17 higher levels of insulin and glucose, and higher SBP and DBP than control subjects,  
18 while HDL-cholesterol and TC were significantly lower. There were no significant  
19 differences in TG, LDL-cholesterol or uric acid between the two study groups.

20         In order to delineate the best predictors for the susceptibility of AIS, we have  
21 carried out different logistic regression analyses. Table 3 shows the results of four  
22 automatic stepwise logistic regression analyses with AIS as the dependent variable and  
23 controls as the reference group. Logistic regression #1 is the outcome of an automatic  
24 regression with the IMO&NS biomarkers and the additional demographic/clinical data  
25 as predictors. The results showed that NO<sub>x</sub>, hydroperoxides, IL-6, WBC (positively),  
26 25(OH)D and iron (negatively) together with sex (male) were significant predictors  
27 ( $X^2=171.22$ ,  $df=7$ ,  $p<0.001$ , Nagelkerke=0.717), when 90.1% of all cases were correctly  
28 classified with sensitivity of 92.6% and specificity of 87.1%. Logistic regression #2  
29 shows the outcome of a binary logistic analysis with some metabolic, demographic and  
30 clinical variables as predictors. Increased SBP, glucose, insulin, and age were positively  
31 associated with AIS, whereas TC, HDL-cholesterol, not smoking and BMI were inversely  
32 associated with AIS ( $X^2=207.94$ ,  $df=9$ ,  $p<0.001$ , Nagelkerke=0.737), when 89.7% of all

1 cases were correctly classified with sensitivity of 81.8% and specificity of 95.4%.  
2 Regression #3 shows the outcome of an automatic regression with all IMO&NS  
3 biomarkers together and demographic/clinical data as well. The results showed that  
4 the best predictors for AIS were SBP, glucose, NOx, hydroperoxides, IL-6 and WBC (all  
5 positively associated), 25(OH)D (negatively associated) and sex (male) ( $\chi^2=159.64$ ,  
6  $df=8$ ,  $p<0.001$ , Nagelkerke=0.787), when 89.4% of all cases were correctly classified  
7 with sensitivity of 86.2% and specificity of 93.0%. Regression #4 is the outcome of an  
8 automatic logistic regression with the demographic/clinical stroke predictors (BMI,  
9 SBP, DBP, smoking, dyslipidemia, etc) as explanatory variables. We found that sex and  
10 SBP were significantly and positively associated with AIS, whereas not smoking, BMI  
11 and use of antihypertensive medications that were negatively associated with AIS  
12 ( $\chi^2=133.47$ ,  $df=5$ ,  $p<0.001$ , Nagelkerke=0.509), when 79.6% of all cases were correctly  
13 classified with sensitivity of 68.0% and specificity of 89.0%.

14 In order to delineate the associations between the biomarkers and baseline and  
15 endpoint mRS we have carried out multivariate GLM analyses with the IO&NS or  
16 metabolic biomarkers as dependent variables and three diagnostic-outcome groups,  
17 such as AIS with mRS  $\geq 3$ , AIS with mRS  $< 3$  and controls, as explanatory variable and  
18 demographic/clinical data shown in Table 2 as additional covariates. We found  
19 significant effects of the diagnostic-outcome groups on almost all IO&NS biomarkers  
20 and five metabolic markers.

21 Table 4 shows the results of univariate analyses and post-hoc analyses, which  
22 showed significant differences between patients with higher *versus* lower baseline  
23 mRS scores. Ferritin, IL-6, hsCRP, WBC, ESR and glucose were significantly higher in AIS  
24 patients with higher baseline mRS than in those with lower baseline mRS.

25 Table 5 shows the significant univariate effects with post-hoc analyses. Ferritin,  
26 IL-6, hsCRP and ESR are significantly higher in stroke patients with an endpoint mRS  $\geq 3$   
27 *versus* those with an endpoint mRS  $< 3$ , while 25(OH)D is lower in patients with an  
28 increased mRS. With regard to the metabolic biomarkers, only glucose was significantly  
29 higher in AIS patients with an endpoint mRS score  $\geq 3$  than in AIS patients with a mRS  
30 score  $< 3$ .

31

32

## 1 DISCUSSION

2 The main findings of the present study showed that the best biomarkers to AIS  
3 diagnosis after being controlled with demographic and clinical data were sex (male),  
4 SBP, glucose, NOx, hydroperoxides, 25(OH)D, IL-6, and WBC; together, these  
5 biomarkers classified 89.4% of AIS patients, with 86.2% of sensibility, and 93.3% of  
6 specificity. Other important finding showed that the best biomarkers at admission that  
7 were associated with high functional disability (mRS  $\geq 3$ ) were ferritin, IL-6, hsCRP, WBC,  
8 ESR, and glucose. Moreover, the best biomarkers associated with the functional  
9 disability (mRS) at short-time outcome were ferritin, IL-6, hsCRP, ESR, glucose and  
10 25(OH)D. Demographic and clinical data are not sufficient for the AIS diagnosis, as well  
11 as to the prognosis, with low sensitivity (68.0%), underscoring the need for other  
12 biomarkers. Glucose and IL-6 were the best predictor biomarkers for AIS occurrence;  
13 moreover, these biomarkers were associated with high functional disability at  
14 admission, as well as with the poor short-time outcome.

15 Epidemiologic studies have shown that T2DM is an independent risk factor for  
16 incidence [26] and recurrence of AIS [27]. Many deleterious pathways involved T2DM  
17 contribute to the worsening of AIS. These include vascular endothelial dysfunction,  
18 increased in blood-brain barrier (BBB) permeability [28], mitochondrial dysfunction,  
19 oxidative stress [29], and systemic inflammation [30]. Moreover, blood glucose may  
20 cross the BBB and may promote free radical generation and promote protein glycation  
21 with formation of advanced glycation end-products [31]. T2DM and high glucose levels  
22 are also independently associated with worst functional outcome [32] and cognitive  
23 impairment [33] after AIS. In addition, the area of infarction is higher in hyperglycemic  
24 than in patients with normal glycemic, and the size of penumbra increased linearly  
25 with the hyperglycemia [34]. Thereby it can contribute to an increased number of  
26 hospital readmissions and high cost to the healthcare system.

27 We demonstrated that the presence of T2DM contributed with 16.3% on the  
28 changes in IO&NS levels and 19.9% on metabolic biomarkers; however, high glucose  
29 levels, but not the presence of T2DM, predicted the AIS and were associated with poor  
30 mRS at baseline and short-term outcome. A meta-analysis involving 32 studies showed  
31 that patients without DM, the stress hyperglycemia was associated with a three-fold  
32 increased risk of mortality after stroke; moreover, among the survivors, nondiabetic

1 patients with high glucose levels at admission had a greater risk of the poor functional  
2 outcome than those without high glucose levels; on the other hand, in patients with  
3 DM, the stress hyperglycemia was not associated with short-term mortality after  
4 stroke [35]. In addition, other study showed that patients with stress hyperglycemia  
5 had a higher mortality at baseline than patients with T2DM and patients with neither  
6 stress hyperglycemia nor T2DM [36]. However, it is important to highlight that glucose  
7 levels increases in AIS, both in those who have DM and those who do not have a  
8 history of DM. Although in some patients reflects a pre-existing and unrecognized  
9 T2DM, more often it is can be considered as a stress reaction resulting in the increased  
10 release of stress hormones, such as cortisol and epinephrine, which results in an  
11 increased production of glucose [37].

12 Other promising inflammatory biomarkers showed in this study are IL-6, hsCRP,  
13 WBC, ferritin, ESR, and 25(OH)D. The diagnosis of AIS explained 16.1% of the changes  
14 observed in the IL-6 serum levels, and this cytokine predicted AIS, as well as was  
15 associated with the poor mRS at baseline and short-term prognosis independently of  
16 socio-demographic and clinical data, underscoring the well-documented role of IL-6 in  
17 the pathophysiology of AIS. A meta-analyzes showed that IL-6 and hsCRP were able to  
18 distinguish AIS from controls and stroke mimics, such as transient ischemic attack (TIA)  
19 [14]. In addition, the increase IL-6 levels have been associated with increased volume  
20 of the infarcted area [8, 38] and strong correlation with an acute phase response  
21 intensity [39], therefore contributing to neuronal death, severity and poorer prognosis  
22 [8, 38, 40].

23 Although the AIS explain 22.4% of hsCRP alterations, our results showed that  
24 hsCRP is not a predictor to the AIS occurrence; however, this inflammatory biomarker  
25 is associated with functional disability at baseline and at the short-term outcome.  
26 Considering that our results were adjusted with some important confounding variables  
27 that influenced the CRP levels, this result should be compared with the previously  
28 described. Lawlor et al (2008), analyzed 4,610 cases of cardiac heart disease (CHD) and  
29 showed that CRP was associated with potential confounding factors, such as physical  
30 activity, smoking, and BMI, but it was not importantly causally related to the  
31 development of atherosclerosis or CHD after adjusting [41]. On the other hand, a  
32 meta-analysis with 2,269 strokes patients showed that elevated baseline hsCRP levels

1 were independently associated with AIS risk but exhibited no clear effect on  
2 hemorrhagic stroke [5].

3 Many biomarkers have been reported to be useful in predicting outcome after  
4 AIS and hsCRP remains one of the most widely used in clinical [5, 42, 43]. Moreover,  
5 higher CRP levels were associated with infarct volume [8], and positive association  
6 with unfavorable outcome after adjusting for age, sex, baseline functional impairment  
7 when evaluated with neurological impairment using the National Institute of Health  
8 Stroke Scale (NIHSS), stroke subtypes, and conventional risk factors [44]. In addition,  
9 high CRP levels were reported to be an independent predictor of one-year mortality  
10 [45].

11 The present results showed that the WBC counts predicted AIS and were  
12 associated with the poor baseline neurological impairment [46, 47]. Cerebral ischemia  
13 is followed by reperfusion triggers an acute inflammatory response, which implicates  
14 infiltration of leukocytes into the ischemic tissue. Infiltrated leukocytes release  
15 inflammatory cytokines and other immune modulators in the penumbra surrounding  
16 the infarct core causing further neuronal injury [47]. The mechanisms whereby  
17 leukocytes could contribute to ischemic damage may include their participation in  
18 oxidative stress, nitric oxide synthase (NOS) release, and NO synthesis [46]. Peripheral  
19 leukocytes, especially neutrophil count was considered an independent predictor of  
20 occurrence and recurrent ischemic events [9, 48]. ESR was also independent predictors  
21 for poor baseline and short-term stroke outcome [49, 50].

22 Regarding 25(OH)D, our results showed that this biomarker is useful to predict  
23 AIS as well as is associated with short-term outcome. The association between low  
24 levels of 25(OH)D and AIS observed in the present study is consistent with previous  
25 studies performed in other populations worldwide [51–53]. Previously, our group also  
26 showed the important association between vitamin D deficient (VDD) status with the  
27 occurrence of AIS and poor short-term outcome [6]. Vitamin D has been associated  
28 with AIS through several mechanisms, including the regulation of glucose metabolism,  
29 down-regulation of pro-inflammatory cytokines and oxidative stress, and improving  
30 neurotrophic factors [54–57]. These mechanisms may explain the important role of  
31 vitamin D in AIS.

1           The current study demonstrated that iron and ferritin levels did not predict AIS.  
2   However, other studies showed the positive association between ferritin and  
3   occurrence of AIS [7, 58]. Increased plasma levels of ferritin indicate the presence of an  
4   immune-inflammatory or acute phase response [59]. Although we did not find  
5   association in AIS occurrence, ferritin was associated with poor mRS at baseline and  
6   short-term outcome after AIS, as reported previously [58]. The inflammation and  
7   oxidative stress can modulate the ferritin expression, IL-6 induces the production of  
8   hepcidin, the main regulator of plasma iron levels, and the IL-6–hepcidin axis may be  
9   responsible for the hypoferrremia and increase expression of ferritin, then upregulating  
10   an inflammatory microenvironment [60]. In addition, NO<sub>x</sub> has an impact on cellular  
11   iron metabolism, it can affect iron storage, transport, utilization, and upregulates  
12   ferritin [61, 62].

13           Oxidative stress induces neuronal death through different interrelated  
14   mechanisms including lipid peroxidation, protein denaturation, and DNA damage [4].  
15   Thereby, these pathways have significant cellular effects, resulting in tissue destruction  
16   and neuronal death. In the present study, NO<sub>x</sub> and hydroperoxides were predictors for  
17   AIS; however, they were associated neither with baseline mRS nor short-term outcome  
18   mRS.

19           The higher levels of NO<sub>x</sub> than controls observed in the present study are in  
20   agreement with those previously reported [13, 63]. On the other hand, other study  
21   demonstrated that AIS patients had lower plasma NO<sub>x</sub> levels than controls [64]. When  
22   NO is produced in an excessive amount through the activation of neuronal NOS  
23   (nNOS) and inducible NOS (iNOS), it changes from a physiological neuromodulator to a  
24   neurotoxic factor [10, 11]. NO can react with O<sub>2</sub> to produce peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>), a  
25   strong oxidant of proteins, DNA and lipids. In addition, the overexpression of nNOS  
26   and iNOS promotes the upregulating of inflammatory molecules [65]. Although we did  
27   not find association with AIS outcome, studies showed that NO plays a neuronal injury  
28   role, increases infarct size, cerebral vascular injury, and induces neuronal apoptosis, as  
29   well as poor early outcome [13, 66, 67]. The brain contains high levels of  
30   polyunsaturated fatty acids, thus lipid peroxidation is one of the major consequences  
31   of oxidative stress injury [68]. Studies have shown lipid peroxidation markers were

1 higher in patients with AIS [12, 69–71]; moreover, lipid peroxidation can contribute to  
2 deleterious effects on clinical outcome after AIS [12].

3 Finally, when evaluated the socio-demographic and clinical data (without  
4 entering IMO&NS) and the model with smoking, BMI, sex (male), and antihypertensive  
5 showed low sensibility to predict AIS. Smoking and hypertension are a well-recognized  
6 modifiable risk factor for AIS [1, 72]. In the present study, the male sex predicts  
7 occurrence of AIS and this result is in agreement with larger studies [73–75]. Regarding  
8 to BMI obtained in the present study low values were predictors for AIS occurrence  
9 underscoring the paradox role of adiposity in the pathophysiology of cardiovascular  
10 diseases and AIS. Large cohort studies have shown different results, while some  
11 authors showed BMI was a positive association with ischemic stroke risk [76, 77], other  
12 studies demonstrated a non-linear association between BMI and ischemic stroke risk,  
13 wich a wide range of BMIs was associated with a similar risk of stroke; a low BMI was  
14 associated with increased risk [78]; moreover, the risks of death and functional  
15 disability in overweight and obese patients did not differ significantly from normal-  
16 weight patients. However, underweight patients had poor outcomes after AIS [79].  
17 Each decrease in one unit of BMI was associated with a 3% increase in the poor  
18 prognosis and a 6% increase in mortality [80]. Low BMI can result in health risks, such  
19 as low muscle mass, which are associated with worsening nutritional status, poor  
20 physical fitness, inflammation and alteration of the hormonal environment [81].

21 The findings of the present study should be interpreted in the context of its  
22 limitations. First, we did not evaluate the neurologic deficit at admission with NIHSS,  
23 which was not available in the emergency routine clinical practice at that time. Second,  
24 33 (18.75%) AIS patients were not evaluated during the follow-up study period. Third,  
25 we did not consider the stroke subtypes for the statistical analysis of this study.  
26 Strengths of our study are that we used multivariate statistical analyses thereby  
27 adjusting for many confounding variables including age, sex, ethnicity, BMI, smoking,  
28 and therapies that were used before the ischemic event, such as the antihypertensive,  
29 hypolipemiant, and hypoglycemic drugs.

30 Taken together, the results suggest that individuals with high inflammatory  
31 response, hyperglycemic status, hipovitaminose D, hyperferritinemia as well as an  
32 oxidative/antioxidant imbalance may have more chance for AIS and high neurological

1 disability at short-term. Therefore, a panel of laboratory biomarkers, such as glucose,  
2 hsCPR, IL-6, vitamin D, ferritin, WBC, NOx and hydroperoxides, as showed in the  
3 present study, could be useful for helping to the prediction of AIS as well as to the  
4 early evaluation of the short-term outcome of AIS patients.

#### 5 **Conflict of Interest**

6 The authors declare that they have no conflict of interest.

7

#### 8 **REFERENCES**

- 9 1. Benjamin EJ, Virani SS, Callaway CW, et al (2018) Heart Disease and Stroke  
10 Statistics-2018 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*  
11 137:e67–e492.
- 12 2. Feigin VL, Mensah GA, Norrving B, et al (2015) Atlas of the global burden of stroke  
13 (1990-2013): The GBD 2013 study. *Neuroepidemiology* 45:230–236.
- 14 3. Kawabori M, Yenari MA (2015) Inflammatory responses in brain ischemia. *Curr Med*  
15 *Chem* 22:1258–77.
- 16 4. Alexandrova ML, Bochev PG (2005) Oxidative stress during the chronic phase after  
17 stroke. *Free Radic Biol Med* 39:297–316.
- 18 5. Zhou Y, Han W, Gong D, et al (2016) Hs-CRP in stroke: A meta-analysis. *Clin Chim*  
19 *Acta* 453:21–27.
- 20 6. Alfieri DF, Lehmann MF, Oliveira SR, et al (2017) Vitamin D deficiency is associated  
21 with acute ischemic stroke, C-reactive protein, and short-term outcome. *Metab*  
22 *Brain Dis* 32:493–502.
- 23 7. Petrova JJ, Manolov VE, Hadjidekova SP, et al (2015) Is There a Link Between  
24 Changes in Levels of Hepcidin and Stroke? *Clin Lab* 61:1935–9.
- 25 8. Smith CJ, Emsley HCA, Gavin CM, et al (2004) Peak plasma interleukin-6 and other  
26 peripheral markers of inflammation in the first week of ischaemic stroke correlate  
27 with brain infarct volume, stroke severity and long-term outcome. *BMC Neurol* 4:2.
- 28 9. Grau AJ, Boddy AW, Dukovic DA, et al (2004) Leukocyte count as an independent  
29 predictor of recurrent ischemic events. *Stroke* 35:1147–52.
- 30 10. Chen Z, Mou R, Feng D, et al (2017) The role of nitric oxide in stroke. *Med Gas Res*  
31 7:194.
- 32 11. Nanetti L, Taffi R, Vignini A, et al (2007) Reactive oxygen species plasmatic levels in  
33 ischemic stroke. *Mol Cell Biochem* 303:19–25.

- 1 12. Ingrid C, Šiarnik P, Kollár B, et al (2016) Oxidative Stress Markers and Their Dynamic  
2 Changes in Patients after Acute Ischemic Stroke.
- 3 13. Castillo J, Rama R, Dávalos A (2000) Nitric oxide-related brain damage in acute  
4 ischemic stroke. *Stroke* 31:852–7.
- 5 14. Monbailliu T, Goossens J, Hachimi-Idrissi S (2017) Blood protein biomarkers as  
6 diagnostic tool for ischemic stroke: a systematic review. *Biomark Med* 11:503–512.
- 7 15. Carty CL, Keene KL, Cheng Y-C, et al (2015) Meta-Analysis of Genome-Wide  
8 Association Studies Identifies Genetic Risk Factors for Stroke in African Americans.  
9 *Stroke* 46:2063–2068.
- 10 16. Malik R, Traylor M, Pulit SL, et al (2016) Low-frequency and common genetic  
11 variation in ischemic stroke: The METASTROKE collaboration. *Neurology* 87:1306–  
12 1306.
- 13 17. Bonita R, Beaglehole R (1988) Recovery of motor function after stroke. *Stroke*  
14 19:1497–500.
- 15 18. Wang Y, Ji H, Tong Y, Zhang Z (2014) Prognostic Value of Serum 25-Hydroxyvitamin  
16 D in Patients with Stroke. *Neurochem Res* 39:1332–1337.
- 17 19. Park K-Y, Chung P-W, Kim YB, et al (2015) Serum Vitamin D Status as a Predictor of  
18 Prognosis in Patients with Acute Ischemic Stroke. *Cerebrovasc Dis* 40:73–80.
- 19 20. Brazil (2011) Characteristics of the Population and Households: Results of the  
20 Universe. In: *Charact. Popul. Households Results Universe*.  
21 [http://www.ibge.gov.br/english/estatistica/populacao/censo2010/caracteristicas%](http://www.ibge.gov.br/english/estatistica/populacao/censo2010/caracteristicas%7B_%7Dda%7B_%7Dpopulacao/default%7B_%7Dcaracteristicas%7B_%7Dda%7B_%7Dpopulacao.shtm)  
22 [7B\\_%7Dda%7B\\_%7Dpopulacao/default%7B\\_%7Dcaracteristicas%7B\\_%7Dda%7B\\_%7Dpopulacao.shtm](http://www.ibge.gov.br/english/estatistica/populacao/censo2010/caracteristicas%7B_%7Dda%7B_%7Dpopulacao/default%7B_%7Dcaracteristicas%7B_%7Dda%7B_%7Dpopulacao.shtm). Accessed 8 Feb 2015  
23
- 24 21. James PA, Oparil S, Carter BL, et al (2014) 2014 evidence-based guideline for the  
25 management of high blood pressure in adults: report from the panel members  
26 appointed to the Eighth Joint National Committee (JNC 8). *JAMA* 311:507–20.
- 27 22. American Diabetes Association (2014) Standards of medical care in diabetes--2014.  
28 *Diabetes Care* 37 Suppl 1:S14-80.
- 29 23. National Cholesterol Education Program (NCEP) (2002) Third Report of the National  
30 Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and  
31 Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final  
32 report. *Circulation* 106:3143–421.
- 33 24. Gonzalez Flecha B, Llesuy S, Boveris A (1991) Hydroperoxide-initiated  
34 chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and  
35 muscle. *Free Radic Biol Med* 10:93–100.
- 36 25. Navarro-Gonzalvez JA, Garcia-Benayas C, Arenas J (1998) Semiautomated  
37 Measurement of Nitrate in Biological Fluids. *Clin Chem* 44:679–681.

- 1 26. Al-Rubeaan K, Al-Hussain F, Youssef AM, et al (2016) Ischemic Stroke and Its Risk  
2 Factors in a Registry-Based Large Cross-Sectional Diabetic Cohort in a Country  
3 Facing a Diabetes Epidemic. *J Diabetes Res*.
- 4 27. Shou J, Zhou L, Zhu S, Zhang X (2015) Diabetes is an Independent Risk Factor for  
5 Stroke Recurrence in Stroke Patients: A Meta-analysis. *J Stroke Cerebrovasc Dis*  
6 24:1961–1968.
- 7 28. Venkat P, Chopp M, Chen J (2017) Blood-brain barrier disruption, vascular  
8 impairment, and ischemia/ reperfusion damage in diabetic stroke. *J Am Heart Assoc*  
9 6:1–12.
- 10 29. Mishiro K, Imai T, Sugitani S, et al (2014) Diabetes mellitus aggravates hemorrhagic  
11 transformation after ischemic stroke via mitochondrial defects leading to  
12 endothelial apoptosis. *PLoS One*.
- 13 30. Shukla V, Shakya AK, Perez-Pinzon MA, Dave KR (2017) Cerebral ischemic damage in  
14 diabetes: An inflammatory perspective. *J Neuroinflammation* 14:1–22.
- 15 31. Tomlinson DR, Gardiner NJ (2008) Glucose neurotoxicity. *Nat Rev Neurosci* 9:36–45.
- 16 32. Jia Q, Liu G, Zheng H, et al (2014) Impaired Glucose Regulation Predicted 1-Year  
17 Mortality of Chinese Patients With Ischemic Stroke: Data From Abnormal Glucose  
18 Regulation in Patients With Acute Stroke Across China. *Stroke* 45:1498–1500.
- 19 33. Li P, Quan W, Lu D, et al (2016) Association between Metabolic Syndrome and  
20 Cognitive Impairment after Acute Ischemic Stroke: A Cross-Sectional Study in a  
21 Chinese Population. *PLoS One* 11:e0167327.
- 22 34. Rosso C, Attal Y, Deltour S, et al (2011) Hyperglycemia and the fate of apparent  
23 diffusion coefficient-defined ischemic penumbra. *AJNR Am J Neuroradiol* 32:852–6.
- 24 35. Capes SE, Hunt D, Malmberg K, et al (2001) Stress hyperglycemia and prognosis of  
25 stroke in nondiabetic and diabetic patients: A systematic overview. *Stroke* 32:2426–  
26 2432. doi: 10.1161/hs1001.096194
- 27 36. Tziomalos K, Dimitriou P, Bouziana SD, et al (2017) Stress hyperglycemia and acute  
28 ischemic stroke in-hospital outcome. *Metabolism* 67:99–105.
- 29 37. Tuttolomondo A, Maida C, Maugeri R, et al (2015) Relationship between diabetes  
30 and ischemic stroke: Analysis of diabetes-related risk factors for stroke and of  
31 specific patterns of stroke associated with diabetes mellitus. *Diabetes Metab J*.
- 32 38. Shaafi S, Sharifipour E, Rahmanifar R, et al (2014) Interleukin-6, a reliable prognostic  
33 factor for ischemic stroke. *Iran J Neurol* 13:70–6.
- 34 39. Herrmann O, Tarabin V, Suzuki S, et al (2003) Regulation of body temperature and  
35 neuroprotection by endogenous interleukin-6 in cerebral ischemia. *J Cereb Blood*  
36 *Flow Metab* 23:406–15.

- 1 40. Fahmi RM, Elsaid AF (2016) Infarction Size, Interleukin-6, and Their Interaction Are  
2 Predictors of Short-Term Stroke Outcome in Young Egyptian Adults. *J Stroke*  
3 *Cerebrovasc Dis* 25:2475–2481.
- 4 41. Lawlor D a., Harbord RM, Timpson NJ, et al (2008) The association of C-reactive  
5 protein and CRP genotype with coronary heart disease: Findings from five studies  
6 with 4,610 cases amongst 18,637 participants. *PLoS One*.
- 7 42. Vila N, Castillo J, Davalos A, Chamorro A (2000) Proinflammatory Cytokines and  
8 Early Neurological Worsening in Ischemic Stroke. *Stroke* 31:2325–2329.
- 9 43. Yu H, Huang Y, Chen X, et al (2017) High-sensitivity C-reactive protein in stroke  
10 patients – The importance in consideration of influence of multiple factors in the  
11 predictability for disease severity and death. *J Clin Neurosci* 36:12–19.
- 12 44. Matsuo R, Ago T, Hata J, et al (2016) Plasma C-reactive protein and clinical  
13 outcomes after acute ischemic stroke: A prospective observational study. *PLoS One*  
14 11:1–12.
- 15 45. Li Y-M, Liu X-Y (2015) Serum levels of procalcitonin and high sensitivity C-reactive  
16 protein are associated with long-term mortality in acute ischemic stroke. *J Neurol*  
17 *Sci* 352:68–73.
- 18 46. Garcia-Bonilla L, Benakis C, Moore J, et al (2014) Immune mechanisms in cerebral  
19 ischemic tolerance. *Front Neurosci* 8:44.
- 20 47. Kim JY, Park J, Chang JY, et al (2016) Inflammation after Ischemic Stroke: The Role of  
21 Leukocytes and Glial Cells. *Exp Neurobiol* 25:241–251.
- 22 48. Wu T-H, Chien K-L, Lin H-J, et al (2013) Total white blood cell count or neutrophil  
23 count predict ischemic stroke events among adult Taiwanese: report from a  
24 community-based cohort study. *BMC Neurol* 13:7.
- 25 49. Balestrino M, Partinico D, Finocchi C, Gandolfo C (1998) White blood cell count and  
26 erythrocyte sedimentation rate correlate with outcome in patients with acute  
27 ischemic stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 7:139–44.
- 28 50. Chamorro A, Vila N, Ascaso C, et al (1995) Early prediction of stroke severity. Role of  
29 the erythrocyte sedimentation rate. *Stroke* 26:573–6.
- 30 51. Chaudhuri JR, Mridula KR, Alladi S, et al (2014) Serum 25-hydroxyvitamin d  
31 deficiency in ischemic stroke and subtypes in Indian patients. *J stroke* 16:44–50.
- 32 52. Pilz S, Dobnig H, Fischer JE, et al (2008) Low vitamin d levels predict stroke in  
33 patients referred to coronary angiography. *Stroke* 39:2611–3.
- 34 53. Sun Q, Pan a., Hu FB, et al (2012) 25-Hydroxyvitamin D Levels and the Risk of  
35 Stroke: A Prospective Study and Meta-analysis. *Stroke* 43:1470–1477.

- 1 54. Zhang Y, Leung DYM, Richers BN, et al (2012) Vitamin D inhibits monocyte/  
2 macrophage proinflammatory cytokine production by targeting MAPK phosphatase-  
3 1. *J Immunol* 188:2127–35.
- 4 55. Huang Y-N, Ho Y-J, Lai C-C, et al (2015) 1,25-Dihydroxyvitamin D3 attenuates  
5 endotoxin-induced production of inflammatory mediators by inhibiting MAPK  
6 activation in primary cortical neuron-glia cultures. *J Neuroinflammation* 12:147.
- 7 56. Saif-Elnasr M, Ibrahim IM, Alkady MM (2017) Role of Vitamin D on glycemic control  
8 and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. *J Res Med Sci* 22:22.
- 9 57. Won S, Sayeed I, Peterson BL, et al (2015) Vitamin D prevents  
10 hypoxia/reoxygenation-induced blood-brain barrier disruption via vitamin D  
11 receptor-mediated NF- $\kappa$ B signaling pathways. *PLoS One* 10:e0122821.
- 12 58. Chakraborty B, Vishnoi G, Goswami B, et al (2013) Lipoprotein(a), ferritin, and  
13 albumin in acute phase reaction predicts severity and mortality of acute ischemic  
14 stroke in North Indian Patients. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 22:e159-67. doi:  
15 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2012.10.013
- 16 59. Wang W, Knovich MA, Coffman LG, et al (2010) Serum ferritin: Past, present and  
17 future. *Biochim Biophys Acta* 1800:760–9.
- 18 60. Nemeth E, Rivera S, Gabayan V, et al (2004) IL-6 mediates hypoferremia of  
19 inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J*  
20 *Clin Invest* 113:1271–1276.
- 21 61. Drapier JC, Hirling H, Wietzerbin J, et al (1993) Biosynthesis of nitric oxide activates  
22 iron regulatory factor in macrophages. *EMBO J* 12:3643–9.
- 23 62. Watts RN, Ponka P, Richardson DR (2003) Effects of nitrogen monoxide and carbon  
24 monoxide on molecular and cellular iron metabolism: mirror-image effector  
25 molecules that target iron. *Biochem J* 369:429–40.
- 26 63. Gumanova NG, Teplova N V., Ryabchenko AU, Denisov EN (2015) Serum nitrate and  
27 nitrite levels in patients with hypertension and ischemic stroke depend on diet: A  
28 multicenter study. *Clin Biochem* 48:29–32.
- 29 64. Rashid PA, Whitehurst A, Lawson N, Bath PMW (2003) Plasma nitric oxide  
30 (nitrate/nitrite) levels in acute stroke and their relationship with severity and  
31 outcome. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 12:82–87.
- 32 65. Liu H, Li J, Zhao F, et al (2015) Nitric oxide synthase in hypoxic or ischemic brain  
33 injury. *Rev Neurosci* 26:105–117. doi: 10.1515/revneuro-2014-0041
- 34 66. Zheng L, Ding J, Wang J, et al (2016) Effects and Mechanism of Action of Inducible  
35 Nitric Oxide Synthase on Apoptosis in a Rat Model of Cerebral Ischemia-Reperfusion  
36 Injury. *Anat Rec* 299:246–255. doi: 10.1002/ar.23295

- 1 67. Mohammadi MT (2016) Overproduction of nitric oxide intensifies brain infarction  
2 and cerebrovascular damage through reduction of claudin-5 and ZO-1 expression in  
3 striatum of ischemic brain. *Pathol - Res Pract* 212:959–964.
- 4 68. Bazinet RP, Layé S (2014) Polyunsaturated fatty acids and their metabolites in brain  
5 function and disease. *Nat Rev Neurosci* 15:771–785.
- 6 69. Lee W-C, Wong H-Y, Chai Y-Y, et al (2012) Lipid peroxidation dysregulation in  
7 ischemic stroke: plasma 4-HNE as a potential biomarker? *Biochem Biophys Res*  
8 *Commun* 425:842–7.
- 9 70. Milanlioglu A, Aslan M, Ozkol H, et al (2016) Serum antioxidant enzymes activities  
10 and oxidative stress levels in patients with acute ischemic stroke: influence on  
11 neurological status and outcome. *Wien Klin Wochenschr* 128:169–174.
- 12 71. Ozkul A, Akyol A, Yenisey C, et al (2007) Oxidative stress in acute ischemic stroke. *J*  
13 *Clin Neurosci* 14:1062–1066.
- 14 72. Smilin Bell Aseervatham, Choi S, Krishnan J, K R (2017) Cigarette smoke and related  
15 risk factors in neurological disorders: An update. *Biomed Pharmacother* 85:79–86.
- 16 73. Ong C-T, Wong Y-S, Sung S-F, et al (2017) Sex-related differences in the risk factors  
17 for in-hospital mortality and outcomes of ischemic stroke patients in rural areas of  
18 Taiwan. *PLoS One* 12:e0185361.
- 19 74. Yu C, An Z, Zhao W, et al (2015) Sex differences in stroke subtypes, severity, risk  
20 factors, and outcomes among elderly patients with acute ischemic stroke. *Front*  
21 *Aging Neurosci* 7:1–6.
- 22 75. Appelros P, Stegmayr B, Terent A (2009) Sex differences in stroke epidemiology: A  
23 systematic review. *Stroke* 40:1082–1090.
- 24 76. Song Y-M (2004) Body Mass Index and Ischemic and Hemorrhagic Stroke: A  
25 Prospective Study in Korean Men. *Stroke* 35:831–836.
- 26 77. Kurth T (2002) Body Mass Index and the Risk of Stroke in Men. *Arch Intern Med*  
27 162:2557–2562.
- 28 78. Wassertheil-Smoller S, Fann C, Allman RM, et al (2000) Relation of Low Body Mass  
29 to Death and Stroke in the Systolic Hypertension in the Elderly Program. *Arch Intern*  
30 *Med* 160:494.
- 31 79. Sun W, Huang Y, Xian Y, et al (2017) Association of body mass index with mortality  
32 and functional outcome after acute ischemic stroke. *Sci Rep* 7:1–8.
- 33 80. Saini M, Saqqur M, Shuaib A (2014) Body mass index and acute ischemic stroke  
34 outcomes. *Int J Stroke* 9:618–623.
- 35 81. Casas-Vara A, Santolaria F, Fernández-Bereciartúa A, et al (2012) The obesity  
36 paradox in elderly patients with heart failure: Analysis of nutritional status.  
37 *Nutrition* 28:616–622.

1 **Table 1** Demographic and biomarkers data in subjects with acute ischemic stroke (AIS)  
 2 and healthy controls

Characteristics	Controls (n=176)	AIS Patients (n=176)	F/X <sup>2</sup>	df	P value
Age (years)	63.1 (11.3)	67.7 (12.1)	12.10	1/350	0.001
Sex					
Male	49 (27.8)	103 (58.5)	33.76	1	<0.001
Female	127 (72.2)	73 (41.8)			
Ethnicity					
Caucasian	129 (73.3)	140 (80.5)	2.52	1	0.214
Non Caucasian	47 (26.7)	34 (19.5)			
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	26.8 (4.3)	26.1 (5.4)	1.55	1/305	0.214
Hypertension	77 (45.5)	146 (84.4)	56.82	1	<0.001
Diabetes Mellitus	36 (20.4)	72 (40.9)	17.31	1	<0.001
Dyslipidemia	101 (59.0)	99 (57.3)	0.23	1	0.634
Smoking	12 (6.8)	41 (23.3)	19.30	1	<0.001
Antihypertensive	69 (40.4)	126 (75.4)	44.45	1	<0.001
Hypoglycemic	25 (14.2)	45 (27.9)	8.83	1	0.004
Hypolipemiant	35 (20.7)	50 (31.0)	4.62	1	0.032
SBP (mmHg)	123.4 (2.8)	145.4 (2.8)	25.18	1/268	<0.001
DBP (mmHg)	80.1 (2.0)	89.1 (1.9)	7.64	1/268	0.006
25(OH)D (ng/mL)	29.1 (1.1)	23.1 (1.0)	25.00	1/280	<0.001
NOx (μM/L)	11.2 (1.0)	17.3 (0.9)	32.45	1/238	<0.001
Hydroperoxides (cpm)	22355 (2101)	29357 (1856)	15.95	1/259	<0.001
WBC (cells/mm <sup>3</sup> )	6636 (338)	9669 (284)	78.73	1/240	<0.001
ESR (mm/h)	16.1 (2.0)	21.3 (1.8)	5.91	1/222	0.016
hsCRP (mg/L)	3.2 (2.4)	18.5 (2.1)	84.08	1/282	<0.001
Ferritin (ng/mL)	160.2 (30.5)	258.3 (27.7)	8.96	1/258	0.0031
Iron (μg/mL)	101.4 (4.4)	71.8 (4.1)	39.38	1/282	<0.001
IL-6 (pg/mL)	6.7 (4.6)	18.8 (4.0)	50.26	1/270	<0.001
Homocysteine (μM/L)	12.0 (1.5)	16.6 (1.3)	5.47	1/235	<0.020
Insulin (IU/L)	9.4 (3.4)	28.8 (3.4)	33.19	1/266	<0.001
Glucose (mg/L)	110.2 (5.0)	152.8 (5.0)	63.83	1/276	<0.001
HDL (mg/dL)	50.4 (1.8)	42.4 (1.7)	27.47	1/281	<0.001

Cholesterol (mg/dL)	191.1 (5.4)	171.6 (5.3)	14.93	1/282	<0.001
Triglycerides (mg/dL)	149.2 (11.7)	140.1 (11.5)	2.37	1/282	0.125
LDL (mg/dL)	110.9 (4.9)	101.0 (4.8)	3.4	1/279	0.066
Uric Acid (mg/dL)	4.44 (0.2)	4.86 (0.2)	1.14	1/279	0.286

1 The continuous variables were expressed as marginal mean and standard error (SE); the  
2 categorical variables were expressed as number (n) and percentage (%). BMI: body mass index;  
3 25(OH)D: 25-hydroxyvitamin D; SBP: systolic blood pressure; DBP: diastolic blood pressure;  
4 NOx: nitric oxide metabolites; WBC: white blood cells; ESR: erythrocyte sedimentation rate;  
5 hsCRP: C reactive protein with high sensitivity assay; IL: interleukin; HDL: high density  
6 lipoprotein cholesterol; LDL: low density lipoprotein cholesterol.

7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27

1 **Table 2** Results of two different multivariate GLM analyses the first with 10 IO&NS  
 2 biomarkers and the second with 9 metabolic variables as dependent variables and  
 3 acute ischemic stroke (AIS) *versus* no AIS as explanatory variable while controlling for  
 4 background variables

Type analysis	Dependent variables	Independent variables	F	df	P value	Partial eta-squared
Multivariate	All 10 IO&NS	AIS	16.29	10/147	<0.001	0.526
GLM #1	biomarkers	Sex	2.19	10/147	0.021	0.130
		Age	2.88	10/147	0.003	0.164
		Smoking	1.42	10/147	0.177	0.088
		DM	2.87	10/147	0.003	0.163
		Hypoglycemic	2.44	10/147	0.010	0.142
		BMI	1.03	10/147	0.422	0.065
		Hypolipemiant	1.62	10/147	0.105	0.099
Tests for	NOx	AIS	21.68	1/156	<0.001	0.122
between-	Hydroperoxides	AIS	9.99	1/156	0.002	0.060
subject	25(OH)D	AIS	15.18	1/156	<0.001	0.089
effects	Ferritin	AIS	2.30	1/156	0.131	0.015
	Iron	AIS	22.38	1/156	<0.001	0.125
	IL-6	AIS	30.05	1/156	<0.001	0.161
	Homocysteine	AIS	6.05	1/156	0.015	0.037
	hsCRP	AIS	44.95	1/156	<0.001	0.224
	WBC	AIS	55.45	1/156	<0.001	0.262
	ESR	AIS	2.20	1/156	0.140	0.014
Multivariate	All 9 metabolic	AIS	16.01	9/228	<0.001	0.387
GLM #2	biomarkers	Sex	5.24	9/228	<0.001	0.171
		Age	2.17	9/228	0.025	0.079
		Smoking	0.94	9/228	0.488	0.036
		DM	5.98	9/228	<0.001	0.191
		Hypoglycemic	1.71	9/228	0.087	0.063
		BMI	5.07	9/228	<0.001	0.167
		Hypolipemiant	2.44	9/228	0.011	0.088
		Hypertension	2.96	9/228	0.002	0.105

		Antihypertensive	1.02	9/228	0.429	0.039
		Dyslipidemia	1.99	9/228	0.042	0.073
Tests for	Insulin	AIS	26.05	1/236	<0.001	0.099
between-	Glucose	AIS	48.70	1/236	<0.001	0.171
subject	HDL	AIS	26.87	1/236	<0.001	0.102
effects	Cholesterol	AIS	9.30	1/236	0.003	0.038
	Triglycerides	AIS	0.95	1/236	0.331	0.004
	LDL	AIS	1.68	1/236	0.196	0.007
	Uric Acid	AIS	2.21	1/236	0.139	0.009
	SBP	AIS	17.13	1/236	<0.001	0.068
	DBP	AIS	4.52	1/236	0.035	0.019

---

1 AIS: acute ischemic stroke; IO&NS: inflammatory and oxidative and nitrosative stress; BMI:  
2 body mass index; DM: diabetes mellitus; 25(OH)D: 25-hydroxyvitamin D; WBC: white blood  
3 cells; eNOx: oxide nitric metabolites; IL: interleukin; hsCRP: C-reactive protein with high  
4 sensitivity assay; ESR: erythrocyte sedimentation rate; HDL: high density lipoprotein,  
5 LDL: low density lipoprotein; SBP: systolic blood pressure; DBP: diastolic blood  
6 pressure.

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

- 1 **Table 3** Results of 4 different logistic regression analyses with acute ischemic stroke  
 2 (AIS) as dependent variable and non-stroke as reference group

	Significant explanatory variables	Wald	df	<i>P</i> value	Odds ratio	95% CI
Regression #1	NOx	10.69	1	0.003	1.11	1.05-1.19
	Hydroperoxides	5.12	1	0.007	1.00	1.00-1.01
	25(OH)D	4.28	1	0.038	0.98	0.89-0.97
	Iron	10.46	1	0.001	0.97	0.96-0.99
	IL-6	12.20	1	<0.001	2.02	1.36-3.00
	WBC	19.49	1	<0.001	1.00	1.00-1.01
	Sex	12.61	1	<0.001	10.37	3.87-27.81
Regression #2	SBP	31.36	1	<0.001	1.07	1.04-1.08
	Cholesterol	8.84	1	0.003	0.98	0.98-0.99
	HDL	10.44	1	0.001	0.95	0.92-0.98
	Glucose	15.87	1	<0.001	1.02	1.01-1.04
	Insulin	18.82	1	<0.001	1.06	1.03-1.09
	Age	6.41	1	0.011	1.05	1.01-1.08
	Not Smoking	5.32	1	0.021	0.26	0.08-0.82
	BMI	7.58	1	0.006	0.88	0.80-0.96
Regression #3	SBP	11.60	1	0.001	1.04	1.02-1.06
	Glucose	9.85	1	0.002	1.02	1.01-1.04
	NOx	11.63	1	0.001	1.17	1.07-1.28
	Hydroperoxides	5.37	1	0.020	1.00	1.00-1.01
	25(OH)D	4.77	1	0.029	0.93	0.87-0.99
	IL-6	9.04	1	0.003	2.05	1.28-3.28
	WBC	10.66	1	0.001	1.00	1.00-1.01
	Sex	13.41	1	<0.001	9.53	2.85-31.87
Regression #4	No Smoking	4.92	1	0.027	0.34	0.13-0.88
	BMI	4.85	1	0.028	0.93	0.87-0.99
	Sex	16.99	1	<0.001	3.76	2.00-7.07
	DBP	38.59	1	<0.001	1.05	1.04-1.07
	Antihypertensive	17.37	1	<0.001	0.24	0.12-0.47

1 OR: odds ratio; CI: confidence interval; NOx: nitric oxide metabolites; 25(OH)D: 25-  
2 hydroxyvitamin D; IL: interleukin; WBC: white blood cells; SBP: systolic blood pressure; HDL:  
3 high density lipoprotein; BMI: body mass index; DBP: diastolic blood pressure.

4 #1: Correctly classified: 90.1%; Sensitivity: 92.6%; Specificity: 87.1%

5 #2: Correctly classified: 89.7%; Sensitivity: 81.8%; Specificity: 95.4%

6 #3: Correctly classified: 89.4%; Sensitivity: 86.2%; Specificity: 93.0%

7 #4: Correctly classified: 79.6%; Sensitivity: 68.0%; Specificity: 89.0%

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

1 **Table 4** Results of univariate GLM analyses with acute ischemic stroke (AIS)  
 2 patient groups divided according to baseline mRS <3 or baseline mRS ≥3 and controls  
 3 as explanatory variable.

Biomarkers	Controls <sup>A</sup> (n=176)	AIS mRS <3 <sup>B</sup> (n=35)	AIS mRS ≥3 <sup>C</sup> (n=132)	F	df	P value
Ferritin (ng/mL)	152.1 (30.8) <sup>C</sup>	178.7 (51.6) <sup>C</sup>	289.6 (27.4) <sup>A,B</sup>	8.58	2/286	<0.001
IL-6 (pg/mL)	6.5 (4.7) <sup>C</sup>	8.7 (7.2) <sup>C</sup>	27.5 (4.1) <sup>A,B</sup>	9.11	2/299	<0.001
hsCRP (mg/mL)	4.1 (2.5) <sup>B,C</sup>	16.9 (3.9) <sup>A,C</sup>	22.2 (2.2) <sup>A,B</sup>	47.30	2/310	<0.001
WBC (cells/mm <sup>3</sup> )	6690 (338) <sup>B,C</sup>	8856 (492) <sup>C</sup>	9953 (281) <sup>A,B</sup>	39.98	2/266	<0.001
ESR (mm/h)	17.2 (2.1) <sup>C</sup>	17.5 (3.1) <sup>C</sup>	26.9 (1.8) <sup>A,B</sup>	10.93	2/248	<0.001
Glucose (mg/L)	108.6 (5.0) <sup>A,C</sup>	133.8 (7.8) <sup>A,C</sup>	154.8 (4.6) <sup>A,B</sup>	40.32	2/306	<0.001

4

5 <sup>A,B,C</sup> Results of protected post-hoc analyses carried out when the univariate GLM analyses were  
 6 significant. Results are shown as the estimated marginal mean (SE) values obtained after  
 7 multivariate GLM analysis with the demographic and clinical data as shown in Table 2 as  
 8 additional covariates.

9 AIS: acute ischemic stroke; mRS: modified Rankin Scale; mRS <3: mild functional impairment;  
 10 mRS ≥3: moderate/severe functional impairment; IL: interleukin; hsCRP: C reactive protein  
 11 with high sensitivity assay; WBC: white blood cell; ESR: erythrocyte sedimentation rate

12

13

1 **Table 5** Results of univariate GLM analyses with acute ischemic stroke (AIS) patient groups  
 2 divided according to the endpoint mRS score ( $\geq 3$ ) and endpoint mRS ( $< 3$ ) and subjects  
 3 without AIS (controls)

Biomarkers	Controls (n=176)	AIS mRS $< 3$ (n=46)	AIS mRS $\geq 3$ (n=97)	F	df	P value
NOx ( $\mu\text{M/L}$ )	11.5 (0.9) <sup>B,C</sup>	16.3 (1.2) <sup>A</sup>	16.4 (1.0) <sup>A</sup>	15.76	2/243	<0.001
Hydroperoxides (cpm)	21301 (2557) <sup>B,C</sup>	27347 (3266) <sup>A</sup>	30378 (2621) <sup>A</sup>	9.78	2/262	<0.001
25(OH)D (ng/mL)	29.0 (1.1) <sup>B,C</sup>	25.7 (1.5) <sup>A,C</sup>	20.0 (1.2) <sup>A,B</sup>	21.33	2/285	<0.001
Ferritin (ng/dL)	128.7 (29.3) <sup>C</sup>	161.7 (39.7) <sup>C</sup>	284.3 (29.4) <sup>A,B</sup>	9.82	2/267	<0.001
Iron ( $\mu\text{g/dL}$ )	101.8 (4.3) <sup>B,C</sup>	69.9 (5.9) <sup>A</sup>	66.9 (4.4) <sup>A</sup>	27.05	2/289	<0.001
IL-6 (pg/mL)	5.3 (5.0) <sup>B,C</sup>	12.3 (6.6) <sup>A,C</sup>	31.1 (4.9) <sup>A,B</sup>	34.09	2/276	<0.001
hsCRP (mg/L)	2.9 (2.6) <sup>B,C</sup>	14.3 (3.5) <sup>A,C</sup>	26.1 (2.6) <sup>A,B</sup>	57.08	2/287	<0.001
WBC (cells/mm <sup>3</sup> )	6693 (343) <sup>B,C</sup>	9267 (429) <sup>A</sup>	9955 (317) <sup>A</sup>	35.68	2/243	<0.001
ESR (mm/h)	17.4 (2.1) <sup>C</sup>	20.0 (2.8) <sup>C</sup>	28.8 (2.1) <sup>A,B</sup>	10.65	2/228	<0.001
Insulin (IU/mL)	11.0 (2.8) <sup>B,C</sup>	29.1 (3.8) <sup>A</sup>	22.3 (2.9) <sup>A</sup>	13.96	2/277	<0.001
Glucose (mg/dL)	107.6 (5.1) <sup>B,C</sup>	133.0 (6.9) <sup>A,C</sup>	158.3 (5.2) <sup>A,B</sup>	38.83	2/285	<0.001
HDL (mg/dL)	50.3 (1.8) <sup>B,C</sup>	43.5 (2.4) <sup>A</sup>	40.3 (1.8) <sup>A</sup>	16.42	2/292	<0.001
SBP (mmHg)	125.5 (2.7) <sup>B,C</sup>	151.2 (3.6) <sup>A</sup>	149.3 (2.8) <sup>A</sup>	34.70	2/273	<0.001
DBP (mmHg)	81.9 (1.9) <sup>B,C</sup>	90.7 (2.5) <sup>A</sup>	92.0 (1.9) <sup>A</sup>	11.21	2/273	<0.001

4 Results are shown as the estimated marginal mean (SE) values obtained after multivariate GLM  
 5 analysis with the demographic and clinical data (see Table 2) as additional covariates.

6 <sup>A,B,C</sup> Results of protected post-hoc analyses carried out when the univariate GLM analyses were  
 7 significant; mRS: modified Rankin Scale; mRS  $< 3$ : mild functional impairment; mRS  $\geq 3$ :  
 8 moderate/severe functional impairment; AIS: acute ischemic stroke; NOx: nitric oxide metabolites;  
 9 25(OH)D: 25-hydroxyvitamin D; IL: interleukin; hsCRP: C reactive protein with high sensitivity assay;  
 10 WBC: white blood cells; ESR: erythrocyte sedimentation rate; HDL: high density lipoprotein  
 11 cholesterol; SBP: systolic blood pressure; DBP: diastolic blood pressure.

12

13

1 **ASSOCIATION BETWEEN 3'UNTRANSLATED REGION VARIATION (RS1130864) IN *CRP* GENE**  
2 **AND SHORT-TERM OUTCOME IN ISCHEMIC STROKE PATIENTS**

3

4 Daniela Frizon Alfieri<sup>1</sup>, Tamires Flauzino<sup>1</sup>, Francieli Delongui<sup>1</sup>, Márcio Francisco Lehmann<sup>2</sup>,  
5 Maria Caroline Martins De Araújo<sup>3</sup>, Rafaele Maria Tirolla<sup>4</sup>, Nicolas Pivoto<sup>5</sup>, Elaine Regina  
6 Delicato de Almeida<sup>1,6</sup>, Andréa Name Colado Simão<sup>1,6</sup>, Mariana Ragassi Urbano<sup>7</sup>, Edna Maria  
7 Vissoci Reiche<sup>1,6</sup>.

8

9 <sup>1</sup>Laboratory of Research in Applied Immunology; Health Sciences Center, State University of  
10 Londrina, Londrina, Paraná, Brazil;

11 <sup>2</sup>Department of Clinical Surgery, Health Sciences Center, State University of Londrina,  
12 Londrina, Paraná, Brazil;

13 <sup>3</sup>Outpatient Clinic for Neurology, University Hospital, State University of Londrina, Londrina,  
14 Paraná, Brazil

15 <sup>4</sup>Pharmacy School, Health Sciences Center, State University of Londrina, Londrina, Paraná,  
16 Brazil;

17 <sup>5</sup>Medicine School, Health Sciences Center, State University of Londrina, Londrina, Paraná,  
18 Brazil;

19 <sup>6</sup>Department of Pathology, Clinical Analysis and Toxicology, Health Sciences Center, State  
20 University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil;

21 <sup>7</sup>Department of Statistics, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil.

22

23 **Corresponding author:** Edna Maria Vissoci Reiche, Department of Pathology, Clinical Analysis  
24 and Toxicology, Health Sciences Center, Londrina State University, Av. Robert Koch, 60, CEP  
25 86.038-440, Londrina, Paraná, Brazil. Phone number: +55-43-3371-2619. e-mail:  
26 reiche@sercomtel.com.br; ORCID: 0000-0001-6507-2839

27

## 1 **Abstract**

2

3 **Objective:** This study evaluated the association between the 3'-untranslated region of C-  
4 reactive protein (*CRP*) gene variant (rs1130864) with susceptibility and short-term outcome  
5 of acute ischemic stroke (AIS), as well as with serum levels of CRP and other inflammatory  
6 biomarkers.

7 **Methods:** The study included 168 AIS patients and 166 controls. The functional disability was  
8 evaluated using the modified Rankin Scale (mRS) applied up to eight hours of stroke and  
9 after three-month follow up. Blood samples were obtained up to 24 hours of stroke.

10 **Results:** The median (interquartile range) of high sensitivity CRP (hsCRP), were 7.5 mg/L (2.6-  
11 24.8) in AIS patients and 1.6 (0.7-3.7) mg/L in controls ( $p<0.001$ ). In multivariate analysis, sex  
12 (men) ( $p<0.001$ ), hypertension ( $p<0.001$ ), smoking ( $p=0.015$ ) and hsCRP ( $p<0.001$ ) were  
13 estimated as independent predictors of AIS. No differences were observed in the genotype  
14 distribution between patients and controls; moreover, the genotypes were not associated  
15 with epidemiological and clinical characteristics, as well as with the hsCRP and other  
16 inflammatory biomarkers at baseline in AIS patients ( $p>0.05$ ). On the other hand, controls  
17 with T allele (CT+TT genotypes) showed higher hsCRP levels ( $p=0.005$ ) and more frequency  
18 of hsCRP  $\geq 3$  mg/L than controls carrying CC genotype (OR 2.031, 95% CI: 1.01-4.10,  $p=0.045$ ).  
19 Moreover, age, mRS at baseline and hsCRP predicted functional impairment after three-  
20 month post-stroke only in patients carrying the T allele ( $p<0.001$ ).

21 **Conclusion:** This polymorphic variant was not a determinant factor for AIS susceptibility but  
22 in AIS patients carrying the T allele, the hsCRP levels was associated with the short-term  
23 outcome post-stroke.

24

25

26 **Keywords:** Ischemic stroke; polymorphic variant; C-reactive protein; inflammation;  
27 functional impairment

28

29

30

31

32

## 1 Introduction

2 Acute ischemic stroke (AIS) results from a sudden focal reduction of blood flow to  
3 the brain with neurologic disability, and is a major cause of long-term disability and mortality  
4 worldwide, as well as has significant clinical and socioeconomic impact [1]. About 80% of all  
5 strokes are due to arterial vascular occlusion (ischemic stroke) caused by any or the  
6 combination of unmodifiable risk factors, such as age, sex, and genetic variants, as well as by  
7 modifiable risk factors, such as hypertension, diabetes mellitus type 2 (DMT2), hyperlipemia,  
8 sedentary lifestyle, smoking, and obesity [1].

9 Inflammatory events play a key role in the pathogenesis of cerebral ischemic injury  
10 through the elevation of the inflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ ,  
11 interleukin (IL)-1 and IL-6 [2]. C-reactive protein (CRP), an acute phase protein, is a sensitive  
12 marker of inflammation and tissue damage, and elevated CRP levels have been  
13 independently associated with AIS risk in worldwide populations [3,4] and unfavorable  
14 outcome [5].

15 The combination of sociodemographic and lifestyle factors (smoking, alcohol intake,  
16 hormone replacement therapy), obesity and fat patterning, and prevalent DMT2 explained  
17 13-30% the interindividual variability of the baseline CRP levels [6]. On the other hand,  
18 heritability estimates suggest that 35-60% of the variance in baseline CRP levels is  
19 attributable to genetic variation [6,7]. Polymorphic variations are very common at *CRP* and  
20 each of them seems to affect the CRP serum levels at different ways [8–10].

21 The rs1130864 variation is located in the 3'-untranslated region (UTR) of *CRP* gene,  
22 constitutes a substitution of C to T at +1444 position and the T variant allele has been  
23 associated with higher serum levels of CRP in inflammatory conditions, such as  
24 cardiovascular disease (CVD) [11], periodontitis [12], DMT2 [13], and systemic lupus  
25 erythematosus [14] than the C allele. The role of this polymorphism on the serum levels of  
26 CRP and its association with AIS is still unclarified [15–19]. Therefore, the aim of the present  
27 study was to evaluate the association between the 3'UTR variation (rs1130864) of *CRP* with  
28 the susceptibility for AIS and short-term outcome, as well as with the serum levels of  
29 inflammatory biomarkers, such as high sensitivity CRP (hsCRP), white blood cells (WBC), IL-6,  
30 IL-10, and TNF- $\alpha$ .

31

32

## 1 **Materials and methods**

### 2 *Study Subjects*

3           The protocol was approved by the Institutional Research Ethic Committee of the  
4 State University of Londrina, Paraná State, Brazil (CAAE 0250.0.268.000-11) and a written  
5 consent form was obtained from all the individuals. A total of 168 AIS patients were  
6 consecutively recruited during January 2013 to January 2015 from the Emergency Room of  
7 the University Hospital of State University of Londrina. Briefly, the AIS patients were  
8 diagnosed with focal neurologic signs or symptoms thought to be of vascular origin that  
9 persisted for >24 hour using brain computed tomography (CT) and clinic examination in  
10 baseline conditions. AIS subtypes were defined using the TOAST criteria [20]. Moreover, 166  
11 individuals with no history of stroke and/or myocardial infarction were enrolled in the same  
12 period as controls. Patients and controls with fever, acute infections, hematologic,  
13 inflammatory or autoimmune diseases, with renal or liver failure, cancer, cerebral  
14 hemorrhage, and using inflammatory and antioxidant supplementation were excluded. A  
15 standard questionnaire was used at the admission of the individuals in the study to obtain  
16 demographic, epidemiological, anthropometric, and clinical data of traditional AIS risk  
17 factors and the use of any therapeutic drugs (antihypertension, hypolipemiant and  
18 hypoglycemic) before the inclusion in this study. All the individuals were consecutively  
19 numbered and fully anonymized; moreover, they were acknowledged that they could not be  
20 identified via the paper.

21           Body weight (kg) and height (cm) were reported by the individuals, when it was  
22 possible, or by the patient's family. Body mass index (BMI) was calculated as weight (kg)  
23 divided by height (cm) squared. The ethnicity was self-reported as Caucasian and non-  
24 Caucasian (Asiatic, Black, and Afro-Brazilian) [21]. Baseline blood pressure evaluations were  
25 also obtained at the admission using digital apparatus properly calibrated, and the mean of  
26 these measurements was used in the analysis. An indication of hypertension was the use of  
27 antihypertensive medication [22]; DMT2 was defined as a fasting serum glucose  $\geq 126$  mg/dL,  
28 a non-fasting serum glucose  $\geq 200$  mg/dL and/or use of hypoglycemic medication [23].  
29 Dyslipidemia was defined by the presence of one or more than one of the abnormal serum  
30 lipid concentration: total cholesterol  $\geq 200$  mg/dL, low-density lipoprotein cholesterol  $\geq 130$   
31 mg/dL; high-density lipoprotein cholesterol  $< 40$  mg/dL, triglycerides  $> 150$  mg/dL [24]. The  
32 functional impairment was evaluated using the modified Rankin Scale (mRS) [25] applied

1 within the first 24 hour of admission (baseline) and the values were used to categorize the  
2 patients as mild functional impairment (mRS <3) and moderate/severe (mRS ≥3), as  
3 described previously [3]. To evaluate the three-month follow-up outcome, the mRS was  
4 applied through clinical examination or using telephone interviews with the AIS patients or  
5 their relatives [26] and the AIS patients were categorize as with good outcome (mRS <3) or  
6 with poor outcome (mRS ≥3) [27].

7

### 8 *Inflammatory biomarkers*

9 Peripheral blood samples were obtained under non-fasting state, with and without  
10 EDTA as anticoagulant. From the AIS patients, the samples were obtained at the admission in  
11 the hospital; from controls, the samples were obtained at the time of inclusion in the study.  
12 Plasma, serum and buffy-coat aliquots were immediately separated by centrifugation (2,500  
13 rpm for 15 min) and stored in aliquots at -80 °C until analyzes.

14 Plasma levels of IL-6, TNF- $\alpha$ , and IL-10 were evaluated using a sandwich enzyme-  
15 linked immunosorbent assay (ELISA, eBioscience, San Diego, California, USA). White blood  
16 cell counts and erythrocyte sedimentation rate (ESR) were determined using hematological  
17 autoanalyzers. Serum levels of hsCRP were determined using chemiluminescence  
18 microparticle assay with 0.175 mg/L as limit of detection (Architect, Abbott Laboratory,  
19 Abbott Park, IL, USA). The serum levels of hsCRP were also categorized as < 3 mg/L and ≥ 3  
20 mg/L [28].

21

### 22 *3'UTR variation (rs1130864) in CRP gene*

23 Genomic DNA was extracted from a buffy-coat of peripheral blood cells using a  
24 resin column procedure (Biopur, Biometrix Diagnóstica, Curitiba, PR, Brazil). DNA was used  
25 to amplify a 460 base pairs (bp) fragment of the CRP by polymerase chain reaction (PCR) as  
26 previously reported [29] with some modifications. Briefly, the primers used were  
27 determined according to the GenBank n° M11880.1 [29]. PCR was performed with a final  
28 volume of 25  $\mu$ L, with 0.15mM of each primer, 1.50 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.10 mM dNTP, 1.25 units  
29 thermostable DNA polymerase (Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). PCR  
30 conditions were performed in a thermocycler (Applied Biosystems Veriti™ 96-Well Thermal  
31 Cycler, Life Technologies, Foster City, CA, USA) and comprised of 5 min denaturation at 95°C  
32 for initial denaturation; 37 cycles of 45 sec at 95°C for denaturation, 45 sec at 56°C for the

1 annealing and 45 sec at 72°C for the elongation; and 10 min at 72°C for final elongation. In  
2 all PCR analyses, a negative control (without a DNA sample) was included. The PCR products  
3 were subjected to restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis as described  
4 previously [14]. The C allele includes a restriction site for *Hpy*CH4III, which resulted in 311bp  
5 and 149bp fragments, and the T allele does not include the restriction site, resulting in a  
6 fragment of 460bp. The heterozygous genotype resulted in three fragments (460, 311 and  
7 149bp).

8

### 9 *Statistical Analysis*

10 Statistical analyses were performed to compare the variables between the two  
11 groups (AIS patients and controls). In the univariate analysis, for the quantitative variables  
12 was used the Mann Whitney test because the assumption for the t test was not attend  
13 (normality of the data in both groups). For the qualitative variables were used the Chi-square  
14 test or Fisher exact test. After the univariate analysis, to identify the risk factors for ischemic  
15 stroke, the multivariate logistic regression was assayed. Automatic stepwise regression  
16 analysis was employed to assess the most significant demographic/ clinical and  
17 inflammatory biomarkers that predict mRS after three-month follow up (data natural  
18 logarithm transformed). The statistical significance level used was 0.05, and when the p-  
19 value was <0.05, there was difference between the variables in the groups. All statistical  
20 analyses were performed using IBM SPSS windows version 22. Tests were 2-tailed and an  
21 alpha level of 0.05 indicated statistically significant results.

22

## 23 **Results**

### 24 *Characteristics of the subjects*

25 Table 1 shows the baseline characteristics of AIS patients and controls. In the  
26 univariate analyses, AIS patients are older, with higher percentage of men, smokers,  
27 presence of hypertension, DMT2, use of anti-hypertensive and hypoglycemic drugs  
28 compared to the controls. Moreover, the AIS patients presented higher levels of ESR, total  
29 peripheral leukocyte counts, IL-6 and TNF- $\alpha$  compared to the controls. While 118 (70.7%)  
30 patients presented hsCRP  $\geq$ 3 mg/L, only 44 (27.3%) controls presented hsCRP  $\geq$ 3 mg/L. The  
31 median (IQR) of hsCRP was 7.5 mg/L (2.6-24.8) in AIS patients and 1.6 (0.7-3.7) mg/L in  
32 controls ( $p < 0.001$ ). After multivariate analysis, some of these variables were estimated as

1 independent predictors of AIS, such as sex (men), hypertension, smoking, and hsCRP serum  
2 levels. Each increase of 1 mg/L of hsCRP, the odds increases 1.23 times the AIS occurrence  
3 (95% CI 1.13-1.33). With this multivariate analysis, 77.6% of all AIS patients were correctly  
4 classified with a sensitivity of 79.2% and a specificity of 76.1%. Further, the results of the  
5 multivariate analyzes were used to adjust the evaluation of the association between 3'UTR  
6 variation (rs1130864) and AIS susceptibility.

7

### 8 *3'UTR variation (rs1130864) in CRP gene*

9 The genotype distribution of rs1130864 in controls and AIS patients were consistent  
10 with those expected from the Hardy–Weinberg equilibrium ( $p>0.05$ ). No difference was  
11 observed in genotype distribution when evaluated in an additive as well as in a dominant  
12 model, among AIS patients and controls before and after adjustment for sex, hypertension,  
13 and smoking. The dominant model allows to evaluate the association between T allele and  
14 hsCRP levels; therefore, this model was used for sequential analysis (CC vs CT+TT) (Table 2).

15 Among stroke subtypes, 59 (35.1%) patients had large artery atherosclerosis stroke  
16 (LAAS), 51 (30.4%) lacunar infarct (LAC), 26 (15.5%) cardio-embolic infarct (CEI), 6 (3.5%)  
17 other determined etiology (ODE), and 26 (15.5%) had undetermined etiology (UDE). The  
18 rs1130864 polymorphism (CC vs CT+TT) was not associated with stroke subtype ( $p>0.05$ )  
19 (data not shown).

20 At admission, 124 (79.0%) AIS patients showed moderate/severe functional  
21 impairment with a median mRS of 4.0 (3.0–5.0); after three-month follow up, 90 (67.2%)  
22 patients showed poor outcome, with a median mRS of 4.0 (2.0–6.0) (data not shown). The  
23 presence of T allele (CC *versus* CT+TT genotypes) was not associated with baseline and short-  
24 term outcome mRS ( $p>0.05$ ) (Table 3).

25 The 3'UTR variation (rs1130864) polymorphism was not associated with clinical and  
26 inflammatory biomarkers in patients with AIS ( $p>0.05$ ). However, controls carrying the T  
27 allele (CT+TT genotypes) showed higher hsCRP levels ( $p=0.005$ ) and more frequency of  
28 hsCRP  $\geq 3$  mg/L (OR 2.03, 95% CI: 1.01-4.10,  $p=0.045$ ) than those carrying the CC genotype  
29 (Table 4).

30 In order to delineate the predictors to endpoint (mRS as continuous variables) in  
31 patients with CC genotype and CT+TT genotypes, we carried out two automatic stepwise  
32 univariate regression analyses with mRS short-term outcome values as dependent variables

1 and the demographic/clinical and inflammatory biomarkers as explanatory variables. Table 5  
2 shows that among the AIS patients with CT+TT genotypes, 29.7% of the variance in endpoint  
3 mRS were explained by mRS baseline, age and hsCRP (positively related) ( $p < 0.001$ ). On the  
4 other hand, among the AIS patients with CC genotype, 37.1% of the variance in the endpoint  
5 mRS values were explained by mRS baseline and hypertension (positively related) ( $p < 0.001$ ).

## 6 **Discussion and Conclusion**

7         The main finding of the present study was that the T allele, in heterozygosity or in  
8 homozygosity (CT+TT genotypes), of 3'UTR variation (rs1130864) in *CRP*, by itself, was not  
9 associated with AIS susceptibility, as well as with hsCRP levels and other inflammatory  
10 biomarkers in Brazilian patients; however, after three-month follow-up, only AIS patients  
11 carrying the T allele (CT+TT genotypes), the hsCRP were positively associated with poor  
12 short-term outcome. Other important results of the study were the higher levels of hsCRP  
13 among the controls carrying the T allele in heterozygosity or homozygosity (CT+TT  
14 genotypes) than those with the C allele in homozygosity; moreover, the study reinforced the  
15 variables sex (male), hypertension, smoking and high serum levels of hsCRP as some of  
16 independent predictors of AIS. We will now discuss these findings on a point-by-point basis.

17         To our knowledge, this is the first study carried out to investigate the association  
18 between the rs1130864 *CRP* polymorphic variant with AIS susceptibility, short-term outcome  
19 and hsCRP levels in Brazilian population. The overall distribution of genotypes and alleles  
20 obtained in this cohort is in agreement with previous studies [30,31], but discordant with  
21 those carried out in more genetically homogeneous populations [15,16]. This discrepancy  
22 could be explain based, at least, on genetic differences of our Brazilian subjects [32].  
23 However, the absence of association of this genetic variant with AIS obtained in the present  
24 study is in agreement with previous studies [16,18,19,33,34]. Moreover, raised baseline of  
25 hsCRP levels and the presence of the T allele were associated with high risk of recurrent  
26 ischemic events in patients with symptomatic intracranial atherostenoses [35]. Other study  
27 carried out in Germany population reported an association between rs1130864 polymorphic  
28 variant and ischemic stroke and that C allele was associated with microangiopathic but not  
29 macroangiopathic or cardioembolic stroke subtypes [17].

30         Regarding the association between the 3'UTR variation (rs1130864) in *CRP* gene and  
31 hsCRP serum levels, the present study observed that healthy controls carrying the T allele  
32 (CT+TT genotypes) showed higher hsCRP than those carrying the C allele in homozygosity, as

1 described previously [11,31]. This polymorphic variant influences the CRP levels, probably  
2 because its location in the disproportionately long length 3'-UTR of the *CRP*, indicating a  
3 regulatory role, which could affect the stability of the mRNA and, therefore, increased the  
4 CRP production [11,31]. Previous study [11] showed that this polymorphism was associated  
5 with, approximately, 2-fold difference of CRP levels in healthy volunteers (0.55 vs. 1.04 mg/L  
6 for C allele carriers and TT homozygotes, respectively). A meta-analysis [36] showed that the  
7 mean CRP concentration in C allele carriers without CVD was 2.01 mg/L, and those  
8 homozygous for the T allele had a circulating CRP concentration 0.68 mg/L higher than those  
9 carrying the C allele. Further studies showed that the T allele was associated with higher CRP  
10 levels in healthy subjects [8,9,29,37].

11 Functional genetic variants of *CRP* seem to influence its protein level independently  
12 of other variables, such as BMI and IL-6 levels [10,11,38]. Genetic variation within the 3' UTR  
13 of immune genes is a strong determinant of immune response interfering in the mRNA  
14 stability/degradation, nuclear export, subcellular localization and translation efficiency  
15 [39,40]. Therefore, regulation of mRNA stability is a potentially important step in CRP  
16 production, because CRP mRNA is known to have a short half-life of approximately 2.5 hours  
17 [41]. Moreover, sequence variations can disrupt binding sites for microRNAs (miRNAs)  
18 and/or RNA-binding proteins (RBPs), altering their ability to regulate transcripts [42].  
19 Therefore, it is assumed, that individuals carrying certain *CRP* alleles associated with higher  
20 CRP levels are at higher risk for CVD [19].

21 However, in AIS patients evaluated by previous studies, the association between the  
22 rs1130864 *CRP* polymorphic variant and CRP levels is conflicting. Case-control studies  
23 showed that individuals with CT+TT genotypes presented higher hsCRP levels than those  
24 with CC genotype [19,43]. On the other hand, a study carried out in a Germany cohort  
25 demonstrated that the CT+TT genotypes of patients with myocardial infarct, stroke and  
26 transient ischemic attack (TIA) were not associated with elevated hsCRP levels after  
27 adjustment for age, sex, BMI, smoking, and DMT2 [18]. Other studies with AIS patients also  
28 found no association between T allele and CRP levels [16,33,34]. These controversial results  
29 could be due to differences in genetic profile, race, sample size and study design and argues  
30 for further studies in different ethnic groups to validate these finding.

31 One explanation for the increased levels of CRP among the AIS patients  
32 independently of their rs1130864 genotypes could be due the ischemic event

1 pathophysiology, by itself, and the association with other environmental stimuli. CRP is  
2 induced by inflammatory cytokines and additional genes may regulate CRP levels in ischemic  
3 event [44].

4 The present study reinforces that high hsCRP serum levels as predictor of AIS,  
5 independently of the others risk markers. This finding is consistent with previous studies  
6 carried out in our population [3,45] and others nationwide [4,46]. Many inflammatory  
7 biomarkers have been reported to be useful in predicting clinical outcome after AIS and  
8 hsCRP remains one of the most widely used in clinical practice [46, 47]. Framingham study  
9 shows that high CRP is associated with an increased risk for AIS or TIA [48]. Moreover,  
10 acutely elevated CRP showed significant and positive association with unfavorable outcome  
11 after adjusting for age, sex, baseline functional impairment when evaluated with neurologic  
12 impairment, stroke subtype, and conventional risk factors [5] and independent predictor of  
13 one-year mortality [49].

14 Increases in CRP may reflect a systemic inflammatory response following ischemia  
15 and the extent of injury, it is considering a prognostic biomarker of AIS outcome [50]. Few  
16 studies analyzed the association between rs1130864 *CRP* genetic variant and AIS outcome  
17 [15,33,34]. We did not find association between the frequency rs1130864 *CRP* genetic  
18 variant and the functional impairment after three-month follow up. However, hsCRP  
19 predicted mRS after three-month follow up only in AIS patients carrying the T allele. One  
20 explanation for this result could be that after an ischemic event, inflammatory molecules  
21 remained upregulated for several weeks [51] and sequential blood study demonstrated  
22 significantly elevated CRP, ESR and leukocyte counts even three-month follow up after the  
23 onset of stroke [52]. This inflammatory environment increases RBPs and miRNA [42] that  
24 upregulate CRP expression [53] and enhances the functional impairment outcome. We  
25 suggest that genetic variant in the *CRP* can disrupt the interaction sites for miRNA binding,  
26 which usually leads to stabilization of the mRNA transcript and increased protein levels [54].  
27 Therefore, only AIS patients with T allele could present correlation between hsCRP levels and  
28 mRS after three-month follow-up.

29 The findings of the present study should be interpreted in the context of its  
30 limitations. Firstly, the number of subjects included in our study is small to exclude an  
31 association between rs1130864 *CRP* genetic variant and AIS susceptibility; second, among  
32 the 166 AIS patients, 29 (17.46%) were not evaluated during the follow-up study period. The

1 largest study (50,816 subjects), using a retrospective case control design, on the effects of  
2 *CRP* genetic variants on CRP levels and the risk of AIS strongly indicated that the relation is  
3 not causal [55]. Finally, although patients with clinical autoimmune and infectious conditions  
4 were previously excluded from this study, it is always possible that subclinical diseases could  
5 contributed to changes in the CRP levels.

6 In conclusion, our data showed that rs1130864 *CRP* genetic variant, by itself, was  
7 not a determinant factor for AIS susceptibility, as well as with the hsCRP levels in Brazilian  
8 stroke patients, but in AIS patients carrying the T allele, the hsCRP levels contributed to the  
9 short-term outcome. Therefore, to clarify the role of the *CRP* genetic variant in the causality  
10 of ischemic stroke, a prospective population study would be warranted.

11

## 12 **Conflict of interest**

13 The authors declare that they have no conflict of interest.

14

## 15 **Acknowledgement**

16 The authors expressed their thanks to the Coordenação e Aperfeiçoamento de  
17 Pessoal do Nível Superior for the academic support.

18

## 19 **References**

- 20 [1] Benjamin EJ, Virani SS, Callaway CW, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2018  
21 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* 2018;137:e67–e492.
- 22 [2] Tuttolomondo A, Di Raimondo D, di Sciacca R, et al. Inflammatory Cytokines in Acute  
23 Ischemic Stroke. *Curr. Pharm. Des.* 2008;14:3574–3589.
- 24 [3] Alfieri DF, Lehmann MF, Oliveira SR, et al. Vitamin D deficiency is associated with acute  
25 ischemic stroke, C-reactive protein, and short-term outcome. *Metab. Brain Dis.* 2017;  
26 32:493–502.
- 27 [4] Zhou Y, Han W, Gong D, et al. Hs-CRP in stroke: A meta-analysis. *Clin. Chim. Acta* .  
28 2016;453:21–27.
- 29 [5] Matsuo R, Ago T, Hata J, et al. Plasma C-reactive protein and clinical outcomes after acute  
30 ischemic stroke: A prospective observational study. *PLoS One.* 2016;11:1–12.

31

- 1 [6] Pankow JS, Folsom AR, Cushman M, et al. Familial and genetic determinants of systemic  
2 markers of inflammation: the NHLBI family heart study. *Atherosclerosis*. 2001;154:681–  
3 689.
- 4 [7] MacGregor AJ, Gallimore JR, Spector TD, et al. Genetic Effects on Baseline Values of C-  
5 Reactive Protein and Serum Amyloid A Protein: A Comparison of Monozygotic and  
6 Dizygotic Twins. *Clin. Chem*. 2004;50:130–134.
- 7 [8] Kong H, Qian Y-S, Tang X-F, et al. C-reactive protein (CRP) gene polymorphisms, CRP levels  
8 and risk of incident essential hypertension: findings from an observational cohort of Han  
9 Chinese. *Hypertens. Res*. 2012;35:1019–1023.
- 10 [9] Miller DT, Zee RYL, Danik JS, et al. Association of common CRP gene variants with CRP  
11 levels and cardiovascular events. *Ann. Hum. Genet*. 2005;69:623–638.
- 12 [10] Komurcu-Bayrak E, Erginel-Unaltuna N, Onat a., et al. Association of C-reactive protein  
13 (CRP) gene allelic variants with serum CRP levels and hypertension in Turkish adults.  
14 *Atherosclerosis*. 2009;206:474–479.
- 15 [11] Brull DJ, Serrano N, Zito F, et al. Human CRP Gene Polymorphism Influences CRP Levels:  
16 Implications for the Prediction and Pathogenesis of Coronary Heart Disease. *Arterioscler.*  
17 *Thromb. Vasc. Biol*. 2003;23:2063–2069.
- 18 [12] D’Aiuto F, Casas JP, Shah T, et al. C-reactive protein (+1444C>T) polymorphism influences  
19 CRP response following a moderate inflammatory stimulus. *Atherosclerosis*.  
20 2005;179:413–417.
- 21 [13] Zee RYL, Germer S, Thomas A, et al. C-reactive protein gene variation and type 2 diabetes  
22 mellitus: A case-control study. *Atherosclerosis*. 2008;197:931–936.
- 23 [14] Delongui F, Allyson M, Lozovoy B, et al. C-reactive protein + 1444CT ( rs1130864 ) genetic  
24 polymorphism is associated with the susceptibility to systemic lupus erythematosus and  
25 C-reactive protein levels. 2017;8:1779–1788.
- 26 [15] Guo J, Yu L, Zhang J, et al. CRP gene polymorphism predicts post-stroke functional  
27 outcome in Han Chinese. *Acta Neurol. Scand*. 2014;129:263–268.
- 28 [16] Morita A, Nakayama T, Soma M. Association study between C-reactive protein genes and  
29 ischemic stroke in Japanese subjects. *Am. J. Hypertens*. 2006;19:593–600.
- 30 [17] Kuhlenbaeumer G, Hüge A, Berger K, et al. Genetic variants in the c-reactive protein gene  
31 are associated with microangiopathic ischemic stroke. *Cerebrovasc. Dis*. 2010;30:476–  
32 482.  
33

- 1 [18] Schulz S, Lüdi H, Lierath M, et al. C-reactive protein levels and genetic variants of CRP as  
2 prognostic markers for combined cardiovascular endpoint (cardiovascular death, death  
3 from stroke, myocardial infarction, and stroke/TIA). *Cytokine*. 2016;88:71–76.
- 4 [19] Ladenvall C, Jood K, Blomstrand C, et al. Serum C-reactive protein concentration and  
5 genotype in relation to ischemic stroke subtype. *Stroke*. 2006;37:2018–2023.
- 6 [20] Adams HP, Bendixen BH, Kappelle LJ, et al. Classification of subtype of acute ischemic  
7 stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute  
8 Stroke Treatment. *Stroke*. 1993;24:35–41.
- 9 [21] Brazil. Characteristics of the Population and Households: Results of the Universe. .  
10 Charact. Popul. Households Results Universe. 2011 [cited 2015 Feb 8]. Available from:  
11 [http://www.ibge.gov.br/english/estatistica/populacao/censo2010/caracteristicas%7B\\_%7D](http://www.ibge.gov.br/english/estatistica/populacao/censo2010/caracteristicas%7B_%7Dda%7B_%7Dpopulacao/default%7B_%7Dcaracteristicas%7B_%7Dda%7B_%7Dpopulacao.shtm)  
12 [Dda%7B\\_%7Dpopulacao/default%7B\\_%7Dcaracteristicas%7B\\_%7Dda%7B\\_%7Dpopulacao](http://www.ibge.gov.br/english/estatistica/populacao/censo2010/caracteristicas%7B_%7Dda%7B_%7Dpopulacao.shtm)  
13 [.shtm](http://www.ibge.gov.br/english/estatistica/populacao/censo2010/caracteristicas%7B_%7Dda%7B_%7Dpopulacao.shtm).
- 14 [22] James PA, Oparil S, Carter BL, et al. 2014 evidence-based guideline for the management of  
15 high blood pressure in adults: report from the panel members appointed to the Eighth  
16 Joint National Committee (JNC 8). *JAMA*. 2014;311:507–520.
- 17 [23] American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes--2014. *Diabetes*  
18 *Care*. 2014 [cited 2014 Jul 10];37 Suppl 1:S14–80.
- 19 [24] NCEP ATP III. National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection,  
20 Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III).  
21 *Circulation*. 2002;106:3143–3421.
- 22 [25] Bonita R, Beaglehole R. Recovery of motor function after stroke. *Stroke*. 1988;19:1497–  
23 1500.
- 24 [26] Wang Y, Ji H, Tong Y, et al. Prognostic Value of Serum 25-Hydroxyvitamin D in Patients  
25 with Stroke. *Neurochem. Res.* 2014;39:1332–1337.
- 26 [27] Park K-Y, Chung P-W, Kim YB, et al. Serum Vitamin D Status as a Predictor of Prognosis in  
27 Patients with Acute Ischemic Stroke. *Cerebrovasc. Dis.* 2015;40:73–80.
- 28 [28] Ridker PM. High-sensitivity C-reactive protein and cardiovascular risk: rationale for  
29 screening and primary prevention. *Am. J. Cardiol.* 2003;92:17–22.
- 30 [29] Yan M, Zhao L, Zheng F, et al. The relationship between gene polymorphism and CRP level  
31 in a Chinese Han population. *Biochem. Genet.* 2007;45:1–9.
- 32 [30] Martínez-Calleja A, Quiróz-Vargas I, Parra-Rojas I, et al. Haplotypes in the CRP gene  
33 associated with increased BMI and levels of CRP in subjects with type 2 diabetes or  
34 obesity from southwestern Mexico. *Exp. Diabetes Res.* 2012;2012.

- 1 [31] Suk Danik J, Chasman DI, Cannon CP, et al. Influence of genetic variation in the C-reactive  
2 protein gene on the inflammatory response during and after acute coronary ischemia.  
3 *Ann. Hum. Genet.* 2006;70:705–716.
- 4 [32] Pena SDJ, Di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, et al. The genomic ancestry of individuals  
5 from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. Harpending  
6 H, editor. *PLoS One.* 2011;6:e17063.
- 7 [33] Du J, Yu D, Li X, et al. Association study between C-reactive protein polymorphisms and  
8 ischaemic stroke. *Neurol. Res;*1743132815Y0000000061.
- 9 [34] Montaner J, Fernandez-Cadenas I, Molina CA, et al. Poststroke C-Reactive Protein Is a  
10 Powerful Prognostic Tool Among Candidates for Thrombolysis. *Stroke.* 2006;37:1205–  
11 1210.
- 12 [35] Arenillas JF, Massot A, Alvarez-Sabín J, et al. C-reactive protein gene C1444T  
13 polymorphism and risk of recurrent ischemic events in patients with symptomatic  
14 intracranial atherostenoses. *Cerebrovasc. Dis.* 2009;28:95–102.
- 15 [36] Casas JP, Shah T, Cooper J, et al. Insight into the nature of the CRP-coronary event  
16 association using Mendelian randomization. *Int. J. Epidemiol.* 2006;35:922–931.
- 17 [37] Marsik C, Sunder-Plassmann R, Jilma B, et al. The C-reactive protein +1444C/T alteration  
18 modulates the inflammation and coagulation response in human endotoxemia. *Clin.*  
19 *Chem.* 2006;52:1952–1957.
- 20 [38] Singh P, Singh M, Nagpal HS, et al. A novel haplotype within C-reactive protein gene  
21 influences CRP levels and coronary heart disease risk in Northwest Indians. *Mol. Biol. Rep.*  
22 2014;5851–5862.
- 23 [39] Conne B, Stutz A, Vassalli J-D. The 3' untranslated region of messenger RNA: A molecular  
24 "hotspot" for pathology? *Nat. Med.* 2000;6:637–641.
- 25 [40] Mignone F, Gissi C, Liuni S, et al. Untranslated regions of mRNAs. *Genome Biol.*  
26 2002;3:REVIEWS0004.
- 27 [41] Lozanski G, Jiang S-L, Samols D, et al. C-Reactive Protein and Serum Amyloid A mRNA  
28 Stability Following Induction by Cytokines. *Cytokine.* 1996;8:534–540.
- 29 [42] Schwerk J, Savan R. Translating the Untranslated Region. *J. Immunol.* 2015;195:2963–  
30 2971.
- 31 [43] Andersson J, Johansson L, Ladenvall P, et al. C-reactive protein is a determinant of first-  
32 ever stroke: prospective nested case-referent study. *Cerebrovasc. Dis.* 2009;27:544–551.  
33

- 1 [44] Youn CS, Choi SP, Kim SH, et al. Serum highly selective C-reactive protein concentration is  
2 associated with the volume of ischemic tissue in acute ischemic stroke. *Am. J. Emerg.*  
3 *Med.* 2012;30:124–128.
- 4 [45] de Sousa Parreira J, Kallaur AP, Lehmann MF, et al. Tumor necrosis factor beta Ncol  
5 polymorphism (rs909253) is associated with inflammatory and metabolic markers in acute  
6 ischemic stroke. *Metab. Brain Dis.* 2015; 30:159–167.
- 7 [46] Everett BM, Kurth T, Buring JE, et al. The relative strength of C-reactive protein and lipid  
8 levels as determinants of ischemic stroke compared with coronary heart disease in  
9 women. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2006;48:2235–2242.
- 10 [47] Yu H, Huang Y, Chen X, et al. High-sensitivity C-reactive protein in stroke patients – The  
11 importance in consideration of influence of multiple factors in the predictability for  
12 disease severity and death. *J. Clin. Neurosci.* 2017;36:12–19.
- 13 [48] Rost NS, Wolf PA, Kase CS, et al. Plasma concentration of C-reactive protein and risk of  
14 ischemic stroke and transient ischemic attack: the Framingham study. *Stroke.*  
15 2001;32:2575–2579.
- 16 [49] Li Y-M, Liu X-Y. Serum levels of procalcitonin and high sensitivity C-reactive protein are  
17 associated with long-term mortality in acute ischemic stroke. *J. Neurol. Sci.* 2015;352:68–  
18 73.
- 19 [50] Bielewicz J, Kurzepa J, Czekajska-chehab E, et al. Can CRP affect the blood-brain barrier  
20 during acute ischemic stroke ? *Pol J Public Heal.* 2015;125:99–102.
- 21 [51] Nilupul Perera M, Ma HK, Arakawa S, et al. Inflammation following stroke. *J. Clin.*  
22 *Neurosci.* 2006;13:1–8.
- 23 [52] Emsley HCA, Smith CJ, Gavin CM, et al. An early and sustained peripheral inflammatory  
24 response in acute ischaemic stroke: relationships with infection and atherosclerosis. *J.*  
25 *Neuroimmunol.* 2003;139:93–101.
- 26 [53] Kim Y, Noren Hooten N, Dluzen DF, et al. Post-transcriptional regulation of the  
27 inflammatory marker C-reactive protein by the RNA-binding protein HuR and miR-637.  
28 *Mol. Cell. Biol.* 2015;35:MCB.00645-15.
- 29 [54] Sethupathy P, Collins FS. MicroRNA target site polymorphisms and human disease. *Trends*  
30 *Genet.* 2008;24:489–497.
- 31 [55] Zacho J, Tybjaerg-Hansen A, Jensen JS, et al. Genetically Elevated C-Reactive Protein and  
32 Ischemic Vascular Disease. *N. Engl. J. Med.* 2008;359:1897–1908.

1 **Table 1** Baseline characteristics of acute ischemic stroke patients and controls from Brazilian  
 2 population

Characteristics	Univariate		<i>p</i> value	Multivariate	
	Controls (n=166)	Stroke Patients (n=168)		OR (95% IC)	<i>p</i> value
Age (years)	63.05 (53.00-73.00)	69.00 (59.00-77.00)	0.010		
Sex					
Female	113 (68.07)	71 (42.26)	<0.001	11.8 (3.99-34.94)	<0.001
Male	53 (31.93)	97 (57.74)			
Ethnicity					
Caucasian	125 (75.30)	124 (76.54)	0.793		
Non- Caucasian	41 (24.70)	38 (23.46)			
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	26.00 (23.73-28.94)	25.39 (22.19-29.05)	0.107		
Hypertension	69 (43.67)	136 (82.42)	<0.001	5.84 (3.03-11.24)	<0.001
DM	36 (21.69)	65 (39.39)	<0.001		
Dyslipidemia	64 (40.51)	59 (35.76)	0.380		
Smoking	12 (7.23)	37 (22.56)	<0.001	3.13 (1.24-7.88)	0.015
Antihypertensive	63 (39.90)	124 (78.50)	<0.001		
Hypoglycemic	24 (15.19)	43 (27.74)	0.007		
Hypolipemiant	33 (20.89)	46 (29.68)	0.073		
WBC (cells/mm <sup>3</sup> )	6250 (5370-7970)	9100 (7245-11200)	<0.001		
ESR (mm/h)	11.00 (5.00-17.00)	14.00 (7.00-28.00)	<0.001		
hsCRP (mg/L)	1.63 (0.76-3.77)	7.50 (2.60-24.80)	<0.001	1.23 (1.13-1.33)	<0.001
≥3 mg/L	44 (27.3)	118 (70.7)	<0.001		
TNF-α (pg/mL)	2.00 (2.00-2.00)	2.00 (2.00-5.00)	0.003		
IL-6 (pg/mL)	3.00 (1.00-5.00)	11.00 (5.00-26.00)	<0.001		
IL-10 (pg/mL)	6.00 (4.00-9.00)	5.00 (2.00-13.00)	0.154		

3 The continuous variables were expressed as median and interquartile range (25%-75%); the  
 4 categorical variables were expressed as number (n) and percentage (%); OR: odds ratio; CI:

1 confidence interval; BMI: body mass index; DM: diabetes mellitus; ESR: erythrocyte sedimentation  
2 rate; hsCRP: high sensitive C reactive protein; TNF- $\alpha$ : tumor necrosis factor alpha; IL: interleukin.  
3

1 **Table 2** Frequency of 3'UTR variation (rs1130864) in *CRP* gene from patients with acute  
 2 ischemic stroke and controls from Brazilian population

	Overall rs1130864 polymorphism				
	Controls (n=166)	Stroke patients (n=168)	<i>p</i> value	Adjusted OR (95% CI)*	Adjusted <i>p</i> value*
CC	91 (54.82)	95 (56.55)		Reference	
CT	63 (37.95)	60 (35.71)	0.911	0.90 (0.48-1.69)	0.750
TT	12 (7.23)	13 (7.74)		0.57 (0.16-1.94)	0.370
Dominant model					
CC	91 (54.82)	95 (56.55)		1.19	
CT+TT	75 (45.18)	73 (43.45)	0.751	(0.65-2.17)	0.568

3 \*Adjusted for sex, hypertension and smoking.

4 Categorical data were expressed as absolute number (n) and percentage (%); the distribution of  
 5 genotypes and allelic frequencies were in Hardy-Weinberg equilibrium in patients and controls (chi-  
 6 square test,  $p > 0.05$ ). CI: confidence interval; OR: Odds ratio;

7

1 **Table 3** Frequency of 3'UTR variation (rs1130864) in *CRP* gene according modified Rankin  
 2 Scale (mRS) at baseline and short-term outcome of acute ischemic stroke patients.

Ischemic stroke patients						
	Baseline			Short-term outcome		
	mRS <3 (n=91)	mRS ≥3 (n=68)	OR (95% CI)	mRS <3 (n=78)	mRS ≥3 (n=59)	OR (95% CI)
Dominant model						
CC	73 (80.21)	53 (77.94)	1.14 (0.53-2.48)	56 (71.79)	37 (62.71)	1.51 (0.73-3.11)
CT+TT	18 (19.19)	15 (22.06)	<i>p</i> =0.726	22 (28.21)	22 (37.29)	<i>p</i> =0.260

3 Categorical data were expressed as absolute number (n) and percentage (%); mRS: modified Rankin  
 4 Scale; mRS <3: mild functional impairment; mRS ≥3: moderate/severe functional impairment; CI:  
 5 confidence interval; OR: Odds ratio.  
 6

**Table 4** Demographic, clinical and inflammatory markers according 3'UTR variation (rs1130864) in *CRP* gene in acute ischemic stroke patients and controls from Brazilian population

	Control			Acute ischemic stroke patients		
	CC (n=91)	CT+TT (n=75)	p-value	CC (n=95)	CT+TT (n=73)	P value
Age (years)	65.00 (51.00- 74.00)	63.00 (55.00-71.00)	0.969	68.50 (59.00-77.00)	70.50 (60.0-77.50)	0.859
Sex						
Male/Female	34 (37.36)/ 57 (62.64)	19 (25.33)/ 56 (74.67)	0.098	53 (55.79)/ 42 (44.21)	44 (60.27)/ 29 (39.73)	0.560
Ethnicity						
Caucasian/ NC	65 (71.43)/ 26 (28.57)	15 (20.00)/ 5 (80.00)	0.203	66 (73.33)/ 24 (26.67)	58 (80.56)/ 14 (19.44)	0.281
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	25.46 (23.66-28.80)	26.94 (24.00-29.00)	0.301	25.40 (22.03-29.00)	24.46 (22.61-29.06)	0.551
Hypertension	34 (38.64)	35 (50.00)	0.153	82 (87.23)	54 (76.06)	0.072
Diabetes Mellitus	20 (21.98)	16 (21.33)	0.920	38 (40.43)	27 (38.03)	0.755
Dyslipidemia	33 (37.50)	31 (44.29)	0.388	35 (37.23)	24 (33.80)	0.649
Smoking	7 (7.69)	5 (6.67)	0.800	20 (21.28)	17 (24.29)	0.648
Leukocyte (cells/mm <sup>3</sup> )	6510 (5440-8630)	6110 (5230-7520)	0.204	8800 (7000-11400)	9400 (7400-11500)	0.410
ESR (mm/h)	11.00 (4.00-17.50)	10.00 (5.00-17.00)	0.998	15.00 (7.00-28.00)	12.00 (7.00-30.00)	0.532
hsCRP (mg/L)	1.22 (0.55-2.61)	2.00 (1.20-5.16)	0.005	6.96 (2.90-21.9)	9.50 (2.60-28.90)	0.578
≥3mg/L	19 (21.10)	25 (35.20)	0.045	67 (71.30)	31 (69.9)	0.842
TNF-α (pg/mL)	2.00 (2.00-2.50)	2.00 (2.00-2.00)	0.865	2.00 (2.00-4.00)	3.00 (2.00-5.00)	0.105
IL-6 (pg/mL)	3.00 (1.00-5.00)	3.00 (1.00-7.00)	0.950	11.00 (6.00-29.00)	11.00 (5.00-22.0)	0.505
IL-10 (pg/mL)	6.00 (4.00-8.00)	7.00 (5.00-9.00)	0.069	6.00 (2.00-15.00)	3.50 (2.00-9.00)	0.069

The continuous variables were expressed as median and interquartile range (25%-75%); the categorical variables were expressed as number (n) and percentage (%). NC: No Caucasian; BMI: body mass index; ESR: erythrocyte sedimentation rate; hsCRP: high sensitive C reactive protein; TNF- $\alpha$ : tumor necrosis factor alpha; IL: interleukin

1 **Table 5** Results of automatic stepwise multiple regression analyses mRS short-term  
 2 outcome as dependent variable in patients with acute ischemic stroke (AIS) according 3'UTR  
 3 variation (rs1130864) in *CRP* gene

Genotype	Dependent variable	Explanatory variables	t	p-value	F	df	P value	R <sup>2</sup>
CT+TT	mRS short-term outcome	mRS	3.034	0.004	8.76	3/58	<0.001	29.7%
		baseline*						
		age*	3.034	0.012				
		hsCRP*	2.118	0.039				
CC	mRS short-term outcome	mRS	5.401	<0.001	23.9	2/78	<0.001	37.1%
		baseline*						
		hypertension	2.053	0.044				

4 \*Ln transformed; mRS: modified Rankin Scale;-hsCRP: high sensitivity C-reactive  
 5 protein

6

7

## 1 6. CONCLUSÕES

2 O presente estudo permite as seguintes conclusões:

- 3 • O AVEi apresentou efeitos multivariados nos biomarcadores inflamatórios,  
4 metabólicos e de estresse oxidativo após o controle por variáveis confundidoras.  
5 Testes para efeitos entre indivíduos mostraram que os pacientes com AVEi  
6 apresentaram maiores níveis de NOx, hidroperóxidos, IL-6, homocisteína, usPCR,  
7 leucócitos periféricos, VHS, insulina e glicose, enquanto a 25(OH)D, ferro, HDL e CT  
8 foram significativamente menores comparados aos controles;  
9
- 10 • Dentre os biomarcadores avaliados, os melhores que foram associados ao  
11 diagnóstico de AVEi foram sexo (sexo masculino), PAS, glicose, NOx, hidroperóxidos,  
12 25(OH)D, IL-6 e leucócitos periféricos, independente dos dados demográficos e  
13 clínicos. Juntos, esses biomarcadores classificaram 89,4% dos pacientes com AVEi  
14 com 86,2% de sensibilidade e 93,3% de especificidade.  
15
- 16 • Dentre os biomarcadores avaliados, na admissão hospitalar que que apresentaram  
17 associação com maior incapacidade funcional (mRS  $\geq 3$ ) foram ferritina, IL-6, hsCRP,  
18 leucócitos periféricos, VHS e glicose. E os melhores biomarcadores associados ao  
19 pior prognóstico (mRS  $\geq 3$ ) após 3 meses foram a ferritina, IL-6, usPCR, VHS, glicose e  
20 25(OH)D. Dados demográficos e clínicos não se mostraram suficientes para o  
21 diagnóstico de AVEi, assim como para o prognóstico, ressaltando a necessidade de  
22 utilização de outros biomarcadores.  
23
- 24 • A frequência dos genótipos do polimorfismo rs1130864 do *PCR* nos pacientes com  
25 AVEi não diferiu da observada nos controles, sendo 56,6% para o genótipo CC, 35,7%  
26 para o CT e 7,7% para o TT entre os pacientes e de 54,8% para o genótipo CC, 38,0%  
27 para o CT e 7,2% para o TT entre os controles;  
28
- 29 • O polimorfismo rs1130864 do *PCR* não foi associado a biomarcadores clínicos e  
30 inflamatórios em pacientes com AVEi. Entretanto, controles portadores do alelo T  
31 (genótipos CT + TT) apresentaram maiores níveis de usPCR e maior frequência de

- 1 usPCR  $\geq 3$  mg/L (OR 2,03; IC95%: 1,01-4,10; p=0,045) quando comparados aos com o  
2 genótipo CC;  
3
- 4 • Em apenas pacientes com a presença do alelo T (CT+TT), 29,7% do prognóstico após  
5 3 meses do evento isquêmico foi explicado pelo mRS de entrada, idade e usPCR  
6 (positivamente relacionados). Por outro lado, em pacientes com o genótipo CC, a  
7 usPCR não foi associada com o prognóstico a curto prazo.

## 1 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS 2

3 Os achados do presente estudo descritos e discutidos nos dois artigos originais  
4 devem ser interpretados no contexto de suas limitações. Primeiro, o número de sujeitos  
5 incluídos em nosso estudo é pequeno para excluir uma real associação entre a variante  
6 rs1130864 do *PCR* e a suscetibilidade ao AVEi. Primeiro, não avaliamos o déficit  
7 neurológico na admissão dos pacientes com a escala NIHSS, que no período da realização  
8 deste estudo, não estavam disponíveis na prática clínica de rotina de emergência do  
9 HU/UEL. Terceiro, 33 (18,75%) pacientes com AVEi não foram seguidos clinicamente  
10 durante o período de estudo. Terceiro, não consideramos os subtipos de AVEi para a  
11 análise estatística deste estudo devido ao número reduzido da amostra de pacientes em  
12 cada subtipo. No entanto, salientamos como pontos fortes de nosso estudo o uso de  
13 análises estatísticas multivariadas, ajustando muitas variáveis confundidoras, incluindo  
14 idade, sexo, etnia, IMC, tabagismo e terapias usadas antes do evento isquêmico, como as  
15 drogas anti-hipertensivas, hipolipemiantes e hipoglicemiantes. Embora pacientes vítimas  
16 de AVEi com doenças autoimunes e infecciosas no momento da inclusão tenham sido  
17 excluídos do estudo, é possível que estados subclínicos possam ter contribuído para  
18 mudanças nos níveis séricos dos biomarcadores avaliados.

19 Um painel de biomarcadores como glicose, usPCR IL-6, vitamina D e ferritina,  
20 como demonstrado no presente estudo, pode ser útil para auxiliar a predição de AVEi, bem  
21 como a avaliação precoce do prognóstico a curto prazo após o evento isquêmico. Estes  
22 resultados podem contribuir para melhor entendimento dos mecanismos fisiopatológicos  
23 envolvidos no AVEi e apontar possíveis novos alvos terapêuticos que possam modular a  
24 desregulação das vias inflamatórias, metabólicas e de estresse oxidativo nestes pacientes.

1 **8. REFERÊNCIAS**

- 3 ABDULLAH, A. et al. Evaluation of serum oxidant/antioxidant balance in patients with acute  
4 stroke. **JPMA. The Journal of the Pakistan Medical Association**, v. 63, n. 5, p. 590–3, May 2013.
- 5 ABE, I. M. et al. Stroke Prevalence in a Poor Neighbourhood of São Paulo, Brazil: Applying a  
6 Stroke Symptom Questionnaire. **International Journal of Stroke**, v. 6, n. 1, p. 33–39, 4 Feb.  
7 2011.
- 8 ABRAMCZUK, B.; VILLELA, E. A luta contra o AVC no Brasil. **ComCiência**, n. 109, 2009.
- 9 ABUBAKAR, S. et al. Relationship between admission serum C-reactive protein and short term  
10 outcome following acute ischaemic stroke at a tertiary health institution in Nigeria. **Nigerian**  
11 **Journal of Clinical Practice Medical and Dental Consultants' Association of Nigeria (MDCAN)**,  
12 v.16, n.3, p.320-324 , 2013.
- 13 ADAMS, H. P. et al. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a  
14 multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. **Stroke**, v. 24, n.  
15 1, p. 35–41, Jan. 1993.
- 16 ALBERS, G.M. et al. Transient ischemic attack proposal for a new definition. **New England**  
17 **Journal of Medicine**, v. 347, n.21, p. 1813-1716, 2002.
- 18 AL-RUBEAN, K. et al. Ischemic Stroke and Its Risk Factors in a Registry-Based Large Cross-  
19 Sectional Diabetic Cohort in a Country Facing a Diabetes Epidemic. **Journal of Diabetes**  
20 **Research**, v. 16, 2016.
- 21 ALFIERI, D. F. et al. Vitamin D deficiency is associated with acute ischemic stroke, C-reactive  
22 protein, and short-term outcome. **Metabolic Brain Disease**, v. 32, n. 2, p. 493–502, 14 Apr.  
23 2017.
- 24 ALLEN, C. L.; BAYRAKTUTAN, U. Oxidative stress and its role in the pathogenesis of ischaemic  
25 stroke. **International Journal of Stroke**, v. 4, n. 6, p. 461–470, 2009.
- 26 AMANTEA, D. et al. Post-ischemic brain damage: pathophysiology and role of inflammatory  
27 mediators. **The FEBS journal**, v. 276, n. 1, p. 13–26, Jan. 2009.
- 28 AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of medical care in diabetes--2014. **Diabetes**  
29 **Care**, v. 37 Suppl 1, n. Supplement\_1, p. S14-80, 1 Jan. 2014.
- 30 ANDERSSON, J. et al. C-reactive protein is a determinant of first-ever stroke: prospective nested  
31 case-referent study. **Cerebrovascular Diseases (Basel, Switzerland)**, v. 27, n. 6, p. 544–51, Jan.  
32 2009.
- 33 ARENILLAS, J. F. et al. C-reactive protein predicts further ischemic events in first-ever transient  
34 ischemic attack or stroke patients with intracranial large-artery occlusive disease. **Stroke: a**  
35 **Journal of Cerebral Circulation**, v. 34, n. 10, p. 2463–8, Oct. 2003.
- 36 ASLANYAN, S. et al. Statin administration prior to ischaemic stroke onset and survival:  
37 exploratory evidence from matched treatment-control study. **European Journal of Neurology**,  
38 v. 12, n. 7, p. 493–498, Jul. 2005.
- 39 BAAS, D. et al. Rat oligodendrocytes express the vitamin D(3) receptor and respond to 1,25-  
40 dihydroxyvitamin D(3). **Glia**, v. 31, n. 1, p. 59–68, Jul. 2000.

- 1 BAEUERLE, P. A.; HENKEL, T. Function and activation of NF-kappa B in the immune system.  
2 **Annual Review of Immunology**, v. 12, p. 141–79, Jan. 1994.
- 3 BARONE, F. C.; FEUERSTEIN, G. Z. Inflammatory mediators and stroke: new opportunities for  
4 novel therapeutics. **Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the**  
5 **International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 19, n. 8, p. 819–34, Aug.  
6 1999.
- 7 BAZINET, R. P.; LAYÉ, S. Polyunsaturated fatty acids and their metabolites in brain function and  
8 disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 15, n. 12, p. 771–785, 2014.
- 9 BECKMAN, J. S. Peroxynitrite versus hydroxyl radical: the role of nitric oxide in superoxide-  
10 dependent cerebral injury. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 738, p. 69–75, 17  
11 Nov. 1994.
- 12 BENJAMIN, E. J. et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2018 Update: A Report From the  
13 American Heart Association. **Circulation**, v. 137, n. 12, p. e67–e492, 20 Mar. 2018.
- 14 BENSENOR, I. M. et al. Prevalence of stroke and associated disability in Brazil: National Health  
15 Survey - 2013. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 73, n. 9, p. 746–750, Sep. 2015.
- 16 BEZZI, P. et al. CXCR4-activated astrocyte glutamate release via TNFalpha: amplification by  
17 microglia triggers neurotoxicity. **Nature Neuroscience**, v. 4, n. 7, p. 702–10, Jul. 2001.
- 18 BIELEWICZ, J. et al. Can CRP affect the blood-brain barrier during acute ischemic stroke ? **Pol J**  
19 **Public Health**, v. 125, n. 2, p. 99–102, 2015.
- 20 BOLLAND, M. J. et al. Vitamin D insufficiency and health outcomes over 5 y in older women.  
21 **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 91, n. 1, p. 82–9, Jan. 2010.
- 22 BONITA, R.; BEAGLEHOLE, R. Recovery of motor function after stroke. **Stroke: a Journal of**  
23 **Cerebral Circulation**, v. 19, n. 12, p. 1497–500, Dec. 1988.
- 24 BRASIL. **Sistema de Informações de Mortalidade (SIM) e IBGE**. Disponível em:  
25 <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2011/c08.def>>. Acesso em: 6 jan. 2016.
- 26 BREWER, L. D. et al. Vitamin D hormone confers neuroprotection in parallel with  
27 downregulation of L-type calcium channel expression in hippocampal neurons. **The Journal of**  
28 **Neuroscience**, v. 21, n. 1, p. 98–108, 1 Jan. 2001.
- 29 BRØNDUM-JACOBSEN, P. et al. 25-hydroxyvitamin D and symptomatic ischemic stroke: an  
30 original study and meta-analysis. **Annals of Neurology**, v. 73, n. 1, p. 38–47, Jan. 2013.
- 31 BROWN, G. C.; NEHER, J. J. Microglial phagocytosis of live neurons. **Nature Reviews**  
32 **Neuroscience**, v. 15, n. 4, p. 209–216, 1 Apr. 2014.
- 33 BRUCE, A. J. et al. Altered neuronal and microglial responses to excitotoxic and ischemic brain  
34 injury in mice lacking TNF receptors. **Nature Medicine**, v. 2, n. 7, p. 788–94, Jul. 1996.
- 35 BRULL, D. J. et al. Human CRP Gene Polymorphism Influences CRP Levels: Implications for the  
36 Prediction and Pathogenesis of Coronary Heart Disease. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and**  
37 **Vascular Biology**, v. 23, n. 11, p. 2063–2069, 2003.
- 38 BUSTAMANTE, A. et al. C-reactive protein in the detection of post-stroke infections: systematic  
39 review and individual participant data analysis. **Journal of Neurochemistry**, v. 141, n. 2, p. 305–  
40 314, Apr. 2017.

- 1 CABRAL, N. L. et al. Trends in stroke incidence, mortality and case fatality rates in Joinville,  
2 Brazil: 1995-2006. **Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry**, v. 80, n. 7, p. 749–54,  
3 Jul. 2009.
- 4 CANDELARIO-JALIL, E. Injury and repair mechanisms in ischemic stroke: considerations for the  
5 development of novel neurotherapeutics. **Current Opinion in Investigational Drugs (London,**  
6 **England : 2000)**, v. 10, n. 7, p. 644–54, Jul. 2009.
- 7 CAPES, S. E. et al. Stress hyperglycemia and prognosis of stroke in nondiabetic and diabetic  
8 patients: A systematic overview. **Stroke**, v. 32, n. 10, p. 2426–2432, 2001.
- 9 CARBONE, F.; MACH, F.; MONTECUCCO, F. Update on the role of neutrophils in atherosclerotic  
10 plaque vulnerability. **Current Drug Targets**, v. 16, n. 4, p. 321–33, Jan. 2015.
- 11 CARLSON, C. S. et al. Polymorphisms within the C-Reactive Protein (CRP) Promoter Region Are  
12 Associated with Plasma CRP Levels. **The American Journal of Human Genetics**, v. 77, n. 1, p.  
13 64–77, Jul. 2005.
- 14 CAROLEI, A. et al. Temporary is not always benign: similarities and differences between  
15 transient ischemic attack and angina. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 88, n. 7, p. 708-719, 2013.
- 16 CASTELLANOS, M. et al. Iron intake increases infarct volume after permanent middle cerebral  
17 artery occlusion in rats. **Brain Research**, v. 952, n. 1, p. 1–6, 11 Oct. 2002.
- 18 CASTILLO, J. et al. Molecular signatures of brain injury after intracerebral hemorrhage.  
19 **Neurology**, v. 58, n. 4, p. 624–629, 26 Feb. 2002.
- 20 CASTILLO, J.; RAMA, R.; DÁVALOS, A. Nitric oxide-related brain damage in acute ischemic  
21 stroke. **Stroke: a Journal of Cerebral Circulation**, v. 31, n. 4, p. 852–7, Apr. 2000.
- 22 CEULEMANS, A.-G. et al. The dual role of the neuroinflammatory response after ischemic  
23 stroke: modulatory effects of hypothermia. **Journal of Neuroinflammation**, v. 7, n. 1, p. 74,  
24 2010.
- 25 CHAKRABORTY, B. et al. Lipoprotein(a), ferritin, and albumin in acute phase reaction predicts  
26 severity and mortality of acute ischemic stroke in North Indian Patients. **Journal of Stroke and**  
27 **Cerebrovascular Diseases**, v. 22, n. 7, p. e159-67, Oct. 2013.
- 28 CHAMORRO, Á. et al. The immunology of acute stroke. **Nature Reviews Neurology**, v. 8, n. 7, p.  
29 401–410, 5 Jul. 2012.
- 30 CHAMORRO, Á. et al. Neuroprotection in acute stroke: Targeting excitotoxicity, oxidative and  
31 nitrosative stress, and inflammation. **The Lancet Neurology**, v. 15, n. 8, p. 869–881, 2016.
- 32 CHANG, L.-T. et al. Link between interleukin-10 level and outcome after ischemic stroke.  
33 **Neuroimmunomodulation**, v. 17, n. 4, p. 223–8, Jan. 2010.
- 34 CHAUDHURI, J. R. et al. Serum 25-hydroxyvitamin d deficiency in ischemic stroke and subtypes  
35 in Indian patients. **Journal of Stroke**, v. 16, n. 1, p. 44–50, 2014.
- 36 CHEN, R.; OVBIAGELE, B.; FENG, W. Diabetes and Stroke: Epidemiology, Pathophysiology,  
37 Pharmaceuticals and Outcomes. **The American Journal of the Medical Sciences**, v. 351, n. 4, p.  
38 380–6, Apr. 2016.
- 39 CHERUBINI, A. et al. Potential markers of oxidative stress in stroke. **Free Radical Biology &**  
40 **Medicine**, v. 39, n. 7, p. 841–52, 1 Oct. 2005.

- 1 CHOI, K.-H. et al. The serum ferritin level is an important predictor of hemorrhagic  
2 transformation in acute ischaemic stroke. **European Journal of Neurology**, v. 19, n. 4, p. 570–  
3 577, Apr. 2012.
- 4 CHRISTOV, A.; OTTMAN, J. T.; GRAMMAS, P. Vascular inflammatory, oxidative and protease-  
5 based processes: implications for neuronal cell death in Alzheimer’s disease. **Neurological**  
6 **Research**, v. 26, n. 5, p. 540–6, Jul. 2004.
- 7 CHU, L. et al. Pranlukast reduces neutrophil but not macrophage/microglial accumulation in  
8 brain after focal cerebral ischemia in mice. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 27, n. 3, p. 282–8,  
9 Mar. 2006.
- 10 CONNE, B.; STUTZ, A.; VASSALLI, J.-D. The 3’ untranslated region of messenger RNA: A  
11 molecular “hotspot” for pathology? **Nature Medicine**, v. 6, n. 6, p. 637–641, 1 Jun. 2000.
- 12 COPSTEIN, L.; FERNANDES, J. G.; BASTOS, G. A. N. Prevalence and risk factors for stroke in a  
13 population of Southern Brazil. **Arquivos de Neuro-psiquiatria**, v. 71, n. 5, p. 294–300, May  
14 2013.
- 15 COULTHARD, L. R. et al. p38(MAPK): stress responses from molecular mechanisms to  
16 therapeutics. **Trends in Molecular Medicine**, v. 15, n. 8, p. 369–79, Aug. 2009.
- 17 CURE, M. C. et al. Low-density lipoprotein subfraction, carotid artery intima-media thickness,  
18 nitric oxide, and tumor necrosis factor alpha are associated with newly diagnosed ischemic  
19 stroke. **Annals of Indian Academy of Neurology**, v. 16, n. 4, p. 498–503, Oct. 2013.
- 20 CURRÒ, M. et al. Toxic Effects of Mildly Elevated Homocysteine Concentrations in Neuronal-  
21 Like Cells. **Neurochemical Research**, v. 39, n. 8, p. 1485–1495, 28 Aug. 2014.
- 22 CUZZOCREA, S. et al. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock,  
23 inflammation, and ischemia/reperfusion injury. **Pharmacological Reviews**, v. 53, n. 1, p. 135–  
24 59, Mar. 2001.
- 25 DARSHAN, D.; ANDERSON, G. J. Interacting signals in the control of hepcidin expression.  
26 **BioMetals**, v. 22, n. 1, p. 77–87, 8 Feb. 2009.
- 27 DÁVALOS, A. et al. Iron-related damage in acute ischemic stroke. **Stroke**, v. 25, n. 8, p. 1543–6,  
28 Aug. 1994.
- 29 DÁVALOS, A. et al. Body iron stores and early neurologic deterioration in acute cerebral  
30 infarction. **Neurology**, v. 54, n. 8, p. 1568–74, 25 Apr. 2000.
- 31 DAVIES, C. A. et al. The progression and topographic distribution of interleukin-1beta  
32 expression after permanent middle cerebral artery occlusion in the rat. **Journal of cerebral**  
33 **blood flow and metabolism**, v. 19, n. 1, p. 87–98, Jan. 1999.
- 34 DAVIS, S. et al. Parallel antioxidant and antiexcitotoxic therapy improves outcome after  
35 incomplete global cerebral ischemia in dogs. **Stroke**, v. 28, n. 1, p. 198- 204; discussion 204–5,  
36 Jan. 1997.
- 37 DE KEYSER, J. et al. Neuroprotection in acute ischemic stroke. **Acta Neurologica Belgica**, v. 105,  
38 n. 3, p. 144–8, Sep. 2005.
- 39 DEGRABA, T. J. The role of inflammation after acute stroke: utility of pursuing anti-adhesion  
40 molecule therapy. **Neurology**, v. 51, n. 3 Suppl 3, p. S62-8, Sep. 1998.

- 1 DEL ZOPPO, G. et al. Inflammation and stroke: putative role for cytokines, adhesion molecules  
2 and iNOS in brain response to ischemia. **Brain Pathology (Zurich, Switzerland)**, v. 10, n. 1, p.  
3 95–112, Jan. 2000.
- 4 DEL ZOPPO, G. J.; HALLENBECK, J. M. Advances in the vascular pathophysiology of ischemic  
5 stroke. **Thrombosis Research**, v. 98, n. 3, p. 73–81, 1 May 2000.
- 6 DELONGUI, F. et al. C-reactive protein + 1444CT ( rs1130864 ) genetic polymorphism is  
7 associated with the susceptibility to systemic lupus erythematosus and C-reactive protein  
8 levels. v. 8, p. 1779–1788, 2017.
- 9 DEN HERTOOG, H. M. et al. Variation in the C-reactive protein gene is associated with serum  
10 levels of CRP in patients with acute ischemic stroke. **Cerebrovascular Diseases (Basel,**  
11 **Switzerland)**, v. 29, n. 4, p. 372–5, Jan. 2010.
- 12 DHANDAPANI, K. M.; BRANN, D. W. Transforming growth factor-beta: a neuroprotective factor  
13 in cerebral ischemia. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 39, n. 1, p. 13–22, Jan. 2003.
- 14 DI NAPOLI, M. et al. Evaluation of C-Reactive Protein Measurement for Assessing the Risk and  
15 Prognosis in Ischemic Stroke: A Statement for Health Care Professionals From the CRP Pooling  
16 Project Members. **Stroke**, v. 36, n. 6, p. 1316–1329, 5 May 2005.
- 17 DING, H. et al. Hepcidin is involved in iron regulation in the ischemic brain. **PloS one**, v. 6, n. 9,  
18 p. e25324, 2011.
- 19 DIRNAGL, U.; IADECOLA, C.; MOSKOWITZ, M. A. Pathobiology of ischaemic stroke: an  
20 integrated view. **Trends in Neurosciences**, v. 22, n. 9, p. 391–7, Sep. 1999.
- 21 DRAPIER, J. C. et al. Biosynthesis of nitric oxide activates iron regulatory factor in macrophages.  
22 **The EMBO journal**, v. 12, n. 9, p. 3643–9, Sep. 1993.
- 23 DRECHSLER, C. et al. Vitamin D deficiency is associated with sudden cardiac death, combined  
24 cardiovascular events, and mortality in haemodialysis patients. **European Heart Journal**, v. 31,  
25 n. 18, p. 2253–61, Sep. 2010.
- 26 DU, J. et al. Association study between C-reactive protein polymorphisms and ischaemic stroke.  
27 **Neurological Research**, p. 1743132815Y0000000061, 3 Jun. 2015.
- 28 DUPUIS, J. et al. Genome scan of systemic biomarkers of vascular inflammation in the  
29 Framingham Heart Study: Evidence for susceptibility loci on 1q. **Atherosclerosis**, v. 182, n. 2, p.  
30 307–314, Oct. 2005.
- 31 DZIEDZIC, T. et al. Lower Serum Triglyceride Level Is Associated With Increased Stroke Severity.  
32 **Stroke**, v. 35, n. 6, p. e151-2, Jun. 2004.
- 33 EDWARDS, R. L.; RICKLES, F. R.; BOBROVE, A. M. Mononuclear cell tissue factor: cell of origin  
34 and requirements for activation. **Blood**, v. 54, n. 2, p. 359–70, Aug. 1979.
- 35 EKLUND, C.; LEHTIMÄKI, T.; HURME, M. Epistatic effect of C-reactive protein (CRP) single  
36 nucleotide polymorphism (SNP) +1059 and interleukin-1B SNP +3954 on CRP concentration in  
37 healthy male blood donors. **International Journal of Immunogenetics**, v. 32, n. 4, p. 229–232, 9  
38 Jun. 2005.
- 39 EMERIT, J.; EDEAS, M.; BRICAIRE, F. Neurodegenerative diseases and oxidative stress.  
40 **Biomedicine & pharmacotherapy**, v. 58, n. 1, p. 39–46, Jan. 2004.

- 1 ERNST, E. et al. Leukocytes and the risk of ischemic diseases. **JAMA**, v. 257, n. 17, p. 2318–24, 1  
2 May 1987.
- 3 EVERETT, B. M. et al. The relative strength of C-reactive protein and lipid levels as determinants  
4 of ischemic stroke compared with coronary heart disease in women. **Journal of the American**  
5 **College of Cardiology**, v. 48, n. 11, p. 2235–42, 5 Dec. 2006.
- 6 FARACI, F. M.; BRIAN, J. E. Nitric oxide and the cerebral circulation. **Stroke**, v. 25, n. 3, p. 692–  
7 703, 1 Mar. 1994.
- 8 FAUSTINO, J. V. et al. Microglial Cells Contribute to Endogenous Brain Defenses after Acute  
9 Neonatal Focal Stroke. **Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 36, p. 12992–13001, 7 Sep. 2011.
- 10 FERNANDES, T. G. et al. Early stroke case-fatality rates in three hospital registries in the  
11 Northeast and Southeast of Brazil. **Arquivos de Neuro-psiquiatria**, v. 70, n. 11, p. 869–73, Nov.  
12 2012.
- 13 FEUERSTEIN, G. Z.; WANG, X.; BARONE, F. C. The role of cytokines in the neuropathology of  
14 stroke and neurotrauma. **Neuroimmunomodulation**, v. 5, n. 3–4, p. 143–59, Jan. .
- 15 FONCEA, R. et al. Endothelial cell oxidative stress and signal transduction. **Biological Research**,  
16 v. 33, n. 2, p. 89–96, 2000.
- 17 FONTAINE, L. et al. Molecular characterization and transcriptional analysis of adhE2, the gene  
18 encoding the NADH-dependent aldehyde/alcohol dehydrogenase responsible for butanol  
19 production in alcohologenic cultures of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. **Journal of**  
20 **Bacteriology**, v. 184, n. 3, p. 821–30, Feb. 2002.
- 21 FUKUYAMA, N. et al. Peroxynitrite Formation in Focal Cerebral Ischemia—Reperfusion in Rats  
22 Occurs Predominantly in the Peri-Infarct Region. **Journal of Cerebral Blood Flow &**  
23 **Metabolism**, v. 18, n. 2, p. 123–129, Feb. 1998.
- 24 GABAY, C.; KUSHNER, I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation.  
25 **The New England Journal of Medicine**, v. 340, n. 6, p. 448–54, 11 Feb. 1999.
- 26 GARCIA-BONILLA, L. et al. Inducible nitric oxide synthase in neutrophils and endothelium  
27 contributes to ischemic brain injury in mice. **Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v.  
28 193, n. 5, p. 2531–7, 1 Sep. 2014.
- 29 GARCIA, J. H.; KAMIJYO, Y. Cerebral infarction. Evolution of histopathological changes after  
30 occlusion of a middle cerebral artery in primates. **Journal of Neuropathology and Experimental**  
31 **Neurology**, v. 33, n. 3, p. 408–21, Jul. 1974.
- 32 GARCIA, J.M. et al. Role of interleukin-10 in acute brain injuries. **Frontiers in Neurology**, v. 12,  
33 n. 8, p.1-17, Jun. 2017.
- 34 GARCION, E. et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits the expression of inducible nitric oxide  
35 synthase in rat central nervous system during experimental allergic encephalomyelitis. **Brain**  
36 **research. Molecular Brain Research**, v. 45, n. 2, p. 255–67, May 1997.
- 37 GARCION, E. et al. Expression of inducible nitric oxide synthase during rat brain inflammation:  
38 regulation by 1,25-dihydroxyvitamin D3. **Glia**, v. 22, n. 3, p. 282–94, Mar. 1998.
- 39 GARCION, E. et al. 1,25-dihydroxyvitamin D3 regulates the synthesis of gamma-glutamyl  
40 transpeptidase and glutathione levels in rat primary astrocytes. **Journal of Neurochemistry**, v.  
41 73, n. 2, p. 859–66, Aug. 1999.

- 1 GARDEN, G. A.; MÖLLER, T. Microglia biology in health and disease. **Journal of neuroimmune**  
2 **pharmacology**, v. 1, n. 2, p. 127–37, Jun. 2006.
- 3 GARIBALLA, S. E.; HUTCHIN, T. P.; SINCLAIR, A. J. Antioxidant capacity after acute ischaemic  
4 stroke. **QJM : monthly journal of the Association of Physicians**, v. 95, n. 10, p. 685–90, Oct.  
5 2002.
- 6 GO, A. S. et al. Heart disease and stroke statistics--2014 update: a report from the American  
7 Heart Association. **Circulation**, v. 129, n. 3, p. e28--e292, 21 Jan. 2014.
- 8 GONZALEZ FLECHA, B.; LLESUY, S.; BOVERIS, A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an  
9 assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. **Free Radical Biology &**  
10 **Medicine**, v. 10, n. 2, p. 93–100, Jan. 1991.
- 11 GRAU, A. J. et al. Leukocyte count as an independent predictor of recurrent ischemic events.  
12 **Stroke**; v. 35, n. 5, p. 1147–52, May 2004.
- 13 GREGERSEN, R.; LAMBERTSEN, K.; FINSEN, B. Microglia and macrophages are the major source  
14 of tumor necrosis factor in permanent middle cerebral artery occlusion in mice. **Journal of**  
15 **Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 20, n. 1, p. 53–65, Jan. 2000.
- 16 GUMANOVA, N. G. et al. Serum nitrate and nitrite levels in patients with hypertension and  
17 ischemic stroke depend on diet: A multicenter study. **Clinical Biochemistry**, v. 48, n. 1–2, p. 29–  
18 32, 2015.
- 19 GUO, J. et al. CRP gene polymorphism predicts post-stroke functional outcome in Han Chinese.  
20 **Acta Neurologica Scandinavica**, v. 129, n. 4, p. 263–268, 2014.
- 21 GUPTA, A. et al. Vitamin D status and risk of ischemic stroke in North Indian patients. **Indian**  
22 **Journal of Endocrinology and Metabolism**, v. 18, n. 5, p. 721–5, Sep. 2014.
- 23 HAAPANIEMI, E. et al. Serial measurements of plasma homocysteine levels in early and late  
24 phases of ischemic stroke. **European Journal of Neurology**, v. 14, n. 1, p. 12–17, Jan. 2007.
- 25 HACHINSKI, V. et al. Lipids and stroke: a paradox resolved. **Archives of Neurology**, v. 53, n. 4, p.  
26 303–8, Apr. 1996.
- 27 HAGE, F. G.; SZALAI, A. J. C-Reactive Protein Gene Polymorphisms, C-Reactive Protein Blood  
28 Levels, and Cardiovascular Disease Risk. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 50,  
29 n. 12, p. 1115–1122, 18 Sep. 2007.
- 30 HALLENBECK, J. M. Inflammatory reactions at the blood-endothelial interface in acute stroke.  
31 **Advances in Neurology**, v. 71, p. 281- 97; discussion 297-300, Jan. 1996.
- 32 HARRISON, MJ.; MARSHALL, L.; THOMAS, D.J. Relevance of duration of transient ischaemic  
33 attacks in carotid territory. **British Medical Journal**, v. 1, n. 6127, p. 1578-1579.
- 34 HERRMANN, O. et al. Regulation of body temperature and neuroprotection by endogenous  
35 interleukin-6 in cerebral ischemia. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 23, n. 4,  
36 p. 406–15, Apr. 2003.
- 37 HOFFMAN, S. W.; ROOF, R. L.; STEIN, D. G. A reliable and sensitive enzyme immunoassay  
38 method for measuring 8-isoprostaglandin F2 alpha: a marker for lipid peroxidation after  
39 experimental brain injury. **Journal of neuroscience methods**, v. 68, n. 2, p. 133–6, Oct. 1996.
- 40

- 1 HOSOMI, N. et al. Tumor necrosis factor-alpha neutralization reduced cerebral edema through  
2 inhibition of matrix metalloproteinase production after transient focal cerebral ischemia.  
3 **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 25, n. 8, p. 959–67, Aug. 2005.
- 4 HUANG, Y.-N. et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 attenuates endotoxin-induced production of  
5 inflammatory mediators by inhibiting MAPK activation in primary cortical neuron-glia cultures.  
6 **Journal of Neuroinflammation**, v. 12, n. 1, p. 147, 2015.
- 7 INGRID, C. et al. Oxidative Stress Markers and Their Dynamic Changes in Patients after Acute  
8 Ischemic Stroke. v. 2016, 2016.
- 9 ISHIKAWA, M. et al. Inflammatory responses to ischemia and reperfusion in the cerebral  
10 microcirculation. **Frontiers in bioscience**, v. 9, p. 1339–47, 1 May 2004.
- 11 JAIN, M. et al. The Triglyceride Paradox in Stroke Survivors: A Prospective Study. **Neuroscience**  
12 **Journal**, v. 2013, p. 1–7, 2013.
- 13 JAMES, P. A. et al. 2014 evidence-based guideline for the management of high blood pressure  
14 in adults: report from the panel members appointed to the Eighth Joint National Committee  
15 (JNC 8). **JAMA : the journal of the American Medical Association**, v. 311, n. 5, p. 507–20, 5 Feb.  
16 2014.
- 17 JIA, Q. et al. Impaired Glucose Regulation Predicted 1-Year Mortality of Chinese Patients With  
18 Ischemic Stroke: Data From Abnormal Glucose Regulation in Patients With Acute Stroke Across  
19 China. **Stroke**, v. 45, n. 5, p. 1498–1500, 1 May 2014.
- 20 KANAZAWA, M. et al. Microglia and Monocytes/Macrophages Polarization Reveal Novel  
21 Therapeutic Mechanism against Stroke. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n.  
22 10, 13 Oct. 2017.
- 23 KAUSHIK, R.; MITTAL, M.; GUPTA, A. Serum Ferritin Level-A Predictor of Hemorrhagic  
24 Transformation in Acute Ischaemic Stroke. **International Journal of Contemporary Medical**  
25 **Research**, v. 5, n. 1, p. 24–31, 2018.
- 26 KAWABORI, M.; YENARI, M. A. Inflammatory responses in brain ischemia. **Current Medicinal**  
27 **Chemistry**, v. 22, n. 10, p. 1258–77, 2015.
- 28 KEYNES, R. G.; GARTHWAITE, J. Nitric oxide and its role in ischaemic brain injury. **Current**  
29 **molecular medicine**, v. 4, n. 2, p. 179–91, Mar. 2004.
- 30 KHOSHNAM, S. E. et al. Pathogenic mechanisms following ischemic stroke. **Neurological**  
31 **Sciences**, v. 38, n. 7, p. 1167–1186, 2017.
- 32 KIM, J. Y. et al. Inflammation after Ischemic Stroke: The Role of Leukocytes and Glial Cells.  
33 **Experimental neurobiology**, v. 25, n. 5, p. 241–251, 2016a.
- 34 KIM, S. F.; HURI, D. A.; SNYDER, S. H. Inducible Nitric Oxide Synthase Binds, S-Nitrosylates, and  
35 Activates Cyclooxygenase-2. **Science**, v. 310, n. 5756, p. 1966–1970, 23 Dec. 2005.
- 36 KIMELBERG, H. K. Astrocytic swelling in cerebral ischemia as a possible cause of injury and  
37 target for therapy. **Glia**, v. 50, n. 4, p. 389–97, Jun. 2005.
- 38 KOMURCU-BAYRAK, E. et al. Association of C-reactive protein (CRP) gene allelic variants with  
39 serum CRP levels and hypertension in Turkish adults. **Atherosclerosis**, v. 206, n. 2, p. 474–479,  
40 2009.

- 1 KOTON, S. et al. Low Cholesterol, Statins and Outcomes in Patients with First-Ever Acute  
2 Ischemic Stroke. **Cerebrovascular Diseases**, v. 34, n. 3, p. 213–220, 2012.
- 3 KUHLENBAEUMER, G. et al. Genetic variants in the c-reactive protein gene are associated with  
4 microangiopathic ischemic stroke. **Cerebrovascular Diseases**, v. 30, n. 5, p. 476–482, 2010.
- 5 KUSTER, G. W. et al. Outcome determinants of stroke in a brazilian primary stroke center.  
6 **Stroke research and treatment**, v. 2014, p. 194768, 2014.
- 7 LADEBY, R. et al. Microglial cell population dynamics in the injured adult central nervous  
8 system. **Brain research**, v. 48, n. 2, p. 196–206, Apr. 2005.
- 9 LADENVALL, C. et al. Serum C-reactive protein concentration and genotype in relation to  
10 ischemic stroke subtype. **Stroke**, v. 37, n. 8, p. 2018–2023, 2006.
- 11 LAI, A. Y.; TODD, K. G. Microglia in cerebral ischemia: molecular actions and interactions.  
12 **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 84, n. 1, p. 49–59, Jan. 2006.
- 13 LAI, T. W.; ZHANG, S.; WANG, Y. T. Excitotoxicity and stroke: Identifying novel targets for  
14 neuroprotection. **Progress in Neurobiology**, v. 115, p. 157–188, 1 Apr. 2014.
- 15 LAMBERTSEN, K. L. et al. Microglia protect neurons against ischemia by synthesis of tumor  
16 necrosis factor. **The Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 5, p. 1319–30, 4 Feb. 2009.
- 17 LANGUB, M. C. et al. Evidence of functional vitamin D receptors in rat hippocampus.  
18 **Neuroscience**, v. 104, n. 1, p. 49–56, Jan. 2001.
- 19 LAWLOR, D. A. et al. The association of C-reactive protein and CRP genotype with coronary  
20 heart disease: Findings from five studies with 4,610 cases amongst 18,637 participants. **PLoS**  
21 **ONE**, v. 3, n. 8, 2008.
- 22 LEE, J. S. et al. Triglyceride and HDL-C Dyslipidemia and Risks of Coronary Heart Disease and  
23 Ischemic Stroke by Glycemic Dysregulation Status: The Strong Heart Study. p. 1–9, 2017.
- 24 LEGOS, J. J. et al. Quantitative changes in interleukin proteins following focal stroke in the rat.  
25 **Neuroscience Letters**, v. 282, n. 3, p. 189–92, 24 Mar. 2000.
- 26 LEHMANN, M. F. et al. Inflammatory and metabolic markers and short-time outcome in  
27 patients with acute ischemic stroke in relation to TOAST subtypes. **Metabolic Brain Disease**, v.  
28 30, n. 6, p. 1417–1428, 11 Dec. 2015.
- 29 LI, Y.-M.; LIU, X.-Y. Serum levels of procalcitonin and high sensitivity C-reactive protein are  
30 associated with long-term mortality in acute ischemic stroke. **Journal of the Neurological**  
31 **Sciences**, v. 352, n. 1, p. 68–73, 2015.
- 32 LI, Y. et al. Serum levels of homocysteine at admission are associated with post-stroke  
33 depression in acute ischemic stroke. **Neurological Sciences**, v. 38, n. 5, p. 811–817, 2017.
- 34 LINDGREN, A. et al. Plasma homocysteine in the acute and convalescent phases after stroke.  
35 **Stroke**, v. 26, n. 5, p. 795–800, May 1995.
- 36 LIU, T. et al. Tumor necrosis factor-alpha expression in ischemic neurons. **Stroke**, v. 25, n. 7, p.  
37 1481–8, Jul. 1994.
- 38 LOPES, J. M. et al. Hospitalização por acidente vascular encefálico isquêmico no Brasil: estudo  
39 ecológico sobre possível impacto do Hiperdia. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 19, n. 1,  
40 p. 122–134, Mar. 2016.

- 1 LOZANSKI, G. et al. C-Reactive Protein and Serum Amyloid A mRNA Stability Following  
2 Induction by Cytokines. **Cytokine**, v. 8, n. 7, p. 534–540, Jul. 1996.
- 3 MACGREGOR, A. J. et al. Genetic Effects on Baseline Values of C-Reactive Protein and Serum  
4 Amyloid A Protein: A Comparison of Monozygotic and Dizygotic Twins. **Clinical Chemistry**, v.  
5 50, n. 1, p. 130–134, 1 Jan. 2004.
- 6 MAJUMDAR, V. et al. Vitamin D status, hypertension and ischemic stroke: a clinical perspective.  
7 **Journal of Human Hypertension**, 26 Mar. 2015.
- 8 MANDER, P. et al. Nitric oxide from inflammatory-activated glia synergizes with hypoxia to  
9 induce neuronal death. **Journal of Neuroscience Research**, v. 79, n. 1–2, p. 208–215, 1 Jan.  
10 2005.
- 11 MARTINI, S. R.; KENT, T. A. Hyperglycemia in Acute Ischemic Stroke: A Vascular Perspective.  
12 **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 27, n. 3, p. 435–451, 28 Mar. 2007.
- 13 MATSUO, R. et al. Plasma C-reactive protein and clinical outcomes after acute ischemic stroke:  
14 A prospective observational study. **PLoS ONE**, v. 11, n. 6, p. 1–12, 2016.
- 15 MCCOY, M. K.; TANSEY, M. G. TNF signaling inhibition in the CNS: implications for normal brain  
16 function and neurodegenerative disease. **Journal of Neuroinflammation**, v. 5, p. 45, Jan. 2008.
- 17 MCWHORTER, F. Y. et al. Modulation of macrophage phenotype by cell shape. **Proceedings of**  
18 **the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 43, p. 17253–17258, 22 Oct. 2013.
- 19 MICHOS, E. D. et al. 25-Hydroxyvitamin D deficiency is associated with fatal stroke among  
20 whites but not blacks: The NHANES-III linked mortality files. **Nutrition (Burbank, Los Angeles**  
21 **County, Calif.)**, v. 28, n. 4, p. 367–71, Apr. 2012.
- 22 MIGNONE, F. et al. Untranslated regions of mRNAs. **Genome biology**, v. 3, n. 3, p.  
23 REVIEWS0004, 2002.
- 24 MILLER, D. T. et al. Association of common CRP gene variants with CRP levels and  
25 cardiovascular events. **Annals of Human Genetics**, v. 69, n. 6, p. 623–638, 2005.
- 26 MISHIRO, K. et al. Diabetes mellitus aggravates hemorrhagic transformation after ischemic  
27 stroke via mitochondrial defects leading to endothelial apoptosis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, 2014.
- 28 MOHAMMADI, M. T. Overproduction of nitric oxide intensifies brain infarction and  
29 cerebrovascular damage through reduction of claudin-5 and ZO-1 expression in striatum of  
30 ischemic brain. **Pathology - Research and Practice**, v. 212, n. 11, p. 959–964, Nov. 2016.
- 31 MOLD, C.; GEWURZ, H.; DU CLOS, T. W. Regulation of complement activation by C-reactive  
32 protein. **Immunopharmacology**, v. 42, n. 1–3, p. 23–30, May 1999.
- 33 MONTANER, J. et al. Poststroke C-Reactive Protein Is a Powerful Prognostic Tool Among  
34 Candidates for Thrombolysis. **Stroke**, v. 37, n. 5, p. 1205–1210, 6 Apr. 2006.
- 35 MONTANER, J. et al. Simvastatin in the acute phase of ischemic stroke: a safety and efficacy  
36 pilot trial. **European Journal of Neurology**, v. 15, n. 1, p. 82–90, 7 Dec. 2007.
- 37 MORITA, A.; NAKAYAMA, T.; SOMA, M. Association study between C-reactive protein genes  
38 and ischemic stroke in Japanese subjects. **American Journal of Hypertension**, v. 19, n. 6, p.  
39 593–600, Jun. 2006.

- 1 MUIÑO, E. et al. An Inflammatory Polymorphisms Risk Scoring System for the Differentiation of  
2 Ischemic Stroke Subtypes. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, p. 1–7, 19 Aug. 2015.
- 3 NATIONAL CHOLESTEROL EDUCATION PROGRAM (NCEP). Third Report of the National  
4 Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of  
5 High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. **Circulation**, v. 106, n.  
6 25, p. 3143–421, 17 Dec. 2002.
- 7 NAVARRO-GONZALVEZ, J. A.; GARCIA-BENAYAS, C.; ARENAS, J. Semiautomated Measurement  
8 of Nitrate in Biological Fluids. **Clin. Chem.**, v. 44, n. 3, p. 679–681, 1 Mar. 1998.
- 9 NAVEILHAN, P. et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>, an inducer of glial cell line-derived  
10 neurotrophic factor. **Neuroreport**, v. 7, n. 13, p. 2171–5, 2 Sep. 1996.
- 11 NEMETH, E. et al. IL-6 mediates hypoferremia of inflammation by inducing the synthesis of the  
12 iron regulatory hormone hepcidin. **Journal of Clinical Investigation**, v. 113, n. 9, p. 1271–1276,  
13 2004.
- 14 NILUPUL PERERA, M. et al. Inflammation following stroke. **Journal of Clinical Neuroscience**, v.  
15 13, n. 1, p. 1–8, Jan. 2006.
- 16 NIMPTSCH, K. et al. Association of CRP genetic variants with blood concentrations of C-reactive  
17 protein and colorectal cancer risk. **International Journal of Cancer**, 2014.
- 18 NIWA, M. et al. Time course of expression of three nitric oxide synthase isoforms after  
19 transient middle cerebral artery occlusion in rats. **Neurologia Medico-Chirurgica**, v. 41, n. 2, p.  
20 63- 72; discussion 72–3, Feb. 2001.
- 21 OH, M. S. et al. Long-term prognosis of symptomatic isolated middle cerebral artery disease in  
22 Korean stroke patients. **BMC Neurology**, v. 11, p. 138, Jan. 2011.
- 23 OKUBADEJO, N. U. et al. Exploratory study of plasma total homocysteine and its relationship to  
24 short-term outcome in acute ischaemic stroke in Nigerians. **BMC Neurology**, v. 8, n. 1, p. 26, 12  
25 Dec. 2008.
- 26 PANKOW, J. S. et al. Familial and genetic determinants of systemic markers of inflammation:  
27 the NHLBI family heart study. **Atherosclerosis**, v. 154, n. 3, p. 681–9, 15 Feb. 2001.
- 28 PANNU, R.; SINGH, I. Pharmacological strategies for the regulation of inducible nitric oxide  
29 synthase: neurodegenerative versus neuroprotective mechanisms. **Neurochemistry**  
30 **international**, v. 49, n. 2, p. 170–82, Jul. 2006.
- 31 PARK, K.-Y. et al. Serum Vitamin D Status as a Predictor of Prognosis in Patients with Acute  
32 Ischemic Stroke. **Cerebrovascular Diseases**, v. 40, n. 1–2, p. 73–80, 11 Jul. 2015.
- 33 PENG, J. et al. Hypertriglyceridemia and atherosclerosis. **Lipids in Health and Disease**, v. 16, n.  
34 1, p. 233, 6 Dec. 2017.
- 35 PEPYS, M. B.; HIRSCHFELD, G. M. C-reactive protein: a critical update. **Journal of Clinical**  
36 **Investigation**, v. 111, n. 12, p. 1805–1812, 15 Jun. 2003.
- 37 PÉREZ-DE PUIG, I. et al. IL-10 deficiency exacerbates the brain inflammatory response to  
38 permanent ischemia without preventing resolution of the lesion. **Journal of Cerebral Blood**  
39 **Flow and Metabolism**, v. 33, n. 12, p. 1955–66, Dec. 2013.

- 1 PETTY, M. A.; WETTSTEIN, J. G. Elements of cerebral microvascular ischaemia. **Brain Research.**  
2 **Brain Research Reviews**, v. 36, n. 1, p. 23–34, Aug. 2001.
- 3 PODDAR, R. et al. Homocysteine Induces Expression and Secretion of Monocyte  
4 Chemoattractant Protein-1 and Interleukin-8 in Human Aortic Endothelial Cells. **Circulation**, v.  
5 103, n. 22, p. 2717–2723, 5 Jun. 2001.
- 6 POLIDORI, M. C. et al. Plasma carotenoid and malondialdehyde levels in ischemic stroke  
7 patients: relationship to early outcome. **Free radical research**, v. 36, n. 3, p. 265–8, Mar. 2002.
- 8 PROTTI, G. G. et al. Interleukin-10 may protect against progressing injury during the acute  
9 phase of ischemic stroke. **Arquivos de Neuro-psiquiatria**, v. 71, n. 11, p. 846–51, Nov. 2013.
- 10 PRÜFER, K. et al. Distribution of 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor immunoreactivity in the rat  
11 brain and spinal cord. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 16, n. 2, p. 135–45, Feb. 1999.
- 12 QUAIST, M. J. et al. Perfusion Deficit Parallels Exacerbation of Cerebral Ischemia/Reperfusion  
13 Injury in Hyperglycemic Rats. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 17, n. 5, p. 553–  
14 559, 31 May 1997.
- 15 RAIVICH, G. et al. Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response,  
16 molecular mechanisms and cues to physiological function. **Brain research. Brain Research**  
17 **reviews**, v. 30, n. 1, p. 77–105, Jul. 1999.
- 18 RALLIDIS, L. S. et al. Inflammatory markers and in-hospital mortality in acute ischaemic stroke.  
19 **Atherosclerosis**, v. 189, n. 1, p. 193–7, 11 Nov. 2006.
- 20 RASHID, P. A. et al. Plasma nitric oxide (nitrate/nitrite) levels in acute stroke and their  
21 relationship with severity and outcome. **Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases**, v. 12,  
22 n. 2, p. 82–87, 2003.
- 23 REEVES, M. J. et al. Effect of Pretreatment With Statins on Ischemic Stroke Outcomes. **Stroke**,  
24 v. 39, n. 6, p. 1779–1785, Jun. 2008.
- 25 RIDKER, P. M. High-sensitivity C-reactive protein and cardiovascular risk: rationale for screening  
26 and primary prevention. **The American Journal of Cardiology**, v. 92, n. 4 B, p. 17–22, 2003.
- 27 ROLIM, C. L. R. C.; MARTINS, M. [Quality of care for ischemic stroke in the Brazilian Unified  
28 National Health System]. **Cadernos de Saude Publica**, v. 27, n. 11, p. 2106–16, Nov. 2011.
- 29 ROSAMOND, W. et al. Heart disease and stroke statistics--2008 update: a report from the  
30 American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee.  
31 **Circulation**, v. 117, n. 4, p. e25-146, 29 Jan. 2008.
- 32 ROSELL, A. et al. MMP-9-positive neutrophil infiltration is associated to blood-brain barrier  
33 breakdown and basal lamina type IV collagen degradation during hemorrhagic transformation  
34 after human ischemic stroke. **Stroke**, v. 39, n. 4, p. 1121–6, Apr. 2008.
- 35 ROSSO, C. et al. Hyperglycemia and the fate of apparent diffusion coefficient-defined ischemic  
36 penumbra. **AJNR. American journal of neuroradiology**, v. 32, n. 5, p. 852–6, May 2011.
- 37 ROST, N. S. et al. Plasma concentration of C-reactive protein and risk of ischemic stroke and  
38 transient ischemic attack: the Framingham study. **Stroke**, v. 32, n. 11, p. 2575–9, Nov. 2001.
- 39 ROTHWELL, N. J.; LUHESHI, G. N. Interleukin 1 in the brain: biology, pathology and therapeutic  
40 target. **Trends in Neurosciences**, v. 23, n. 12, p. 618–25, Dec. 2000.

- 1 RYU, W.-S. et al. Association between Serum Lipid Profiles and Early Neurological Deterioration  
2 in Acute Ischemic Stroke. **Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases**, v. 25, n. 8, p. 2024–  
3 2030, Aug. 2016.
- 4 SAEED, S. A. et al. Some new prospects in the understanding of the molecular basis of the  
5 pathogenesis of stroke. **Experimental Brain Research**, v. 182, n. 1, p. 1–10, Sep. 2007.
- 6 SCHALLER, B.; GRAF, R. Cerebral ischemia and reperfusion: the pathophysiologic concept as a  
7 basis for clinical therapy. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 24, n. 4, p. 351–  
8 71, 1 Apr. 2004.
- 9 SCHANDELMAIER, S. et al. Niacin for primary and secondary prevention of cardiovascular  
10 events. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 6, p. CD009744, 14 Jun. 2017.
- 11 SCHULZ, S. et al. C-reactive protein levels and genetic variants of CRP as prognostic markers for  
12 combined cardiovascular endpoint (cardiovascular death, death from stroke, myocardial  
13 infarction, and stroke/TIA). **Cytokine**, v. 88, p. 71–76, 1 Dec. 2016.
- 14 SCHWERK, J.; SAVAN, R. Translating the Untranslated Region. **Journal of immunology**  
15 **(Baltimore, Md. : 1950)**, v. 195, n. 7, p. 2963–71, 1 Oct. 2015.
- 16 SERRANO-PONZ, M. et al. Temporal profiles of blood pressure, circulating nitric oxide, and  
17 adrenomedullin as predictors of clinical outcome in acute ischemic stroke patients. **Molecular**  
18 **Medicine Reports**, v. 13, n. 5, p. 3724–3734, 1 May 2016.
- 19 SHAAFI, S. et al. Interleukin-6, a reliable prognostic factor for ischemic stroke. **Iranian Journal**  
20 **of Neurology**, v. 13, n. 2, p. 70–6, 3 Apr. 2014.
- 21 SHI, Z. et al. Elevated Total Homocysteine Levels in Acute Ischemic Stroke Are Associated With  
22 Long-Term Mortality. **Stroke**, v. 46, n. 9, p. 2419–25, Sep. 2015.
- 23 SHOU, J. et al. Diabetes is an Independent Risk Factor for Stroke Recurrence in Stroke Patients:  
24 A Meta-analysis. **Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases**, v. 24, n. 9, p. 1961–1968,  
25 2015.
- 26 SHUKLA, V. et al. Cerebral ischemic damage in diabetes: An inflammatory perspective. **Journal**  
27 **of Neuroinflammation**, v. 14, n. 1, p. 1–22, 2017.
- 28 SIDOROV, E.; SANGHERA, D. K.; VANAMALA, J. K. P. Biomarker for Ischemic Stroke Using  
29 Metabolome: A Clinician Perspective. **Journal of Stroke**, v. 21, n. 1, p. 31–41, 31 Jan. 2019.
- 30 SIMI, A. et al. Interleukin-1 and inflammatory neurodegeneration. **Biochemical Society**  
31 **Transactions**, v. 35, n. Pt 5, p. 1122–6, Nov. 2007.
- 32 SIMUNDIC, A.-M. et al. Are serum lipids measured on stroke admission prognostic? **Clinical**  
33 **Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 46, n. 8, p. 1163–7, 1 Jan. 2008.
- 34 SINGH, P. et al. A novel haplotype within C-reactive protein gene influences CRP levels and  
35 coronary heart disease risk in Northwest Indians. **Molecular Biology Reports**, p. 5851–5862,  
36 2014.
- 37 SMITH, C. J. et al. Peak plasma interleukin-6 and other peripheral markers of inflammation in  
38 the first week of ischaemic stroke correlate with brain infarct volume, stroke severity and long-  
39 term outcome. **BMC Neurology**, v. 4, p. 2, 15 Jan. 2004.

- 1 SOROND, F. A.; RATAN, R. R. Ironing-Out Mechanisms of Neuronal Injury under Hypoxic–  
2 Ischemic Conditions and Potential Role of Iron Chelators as Neuroprotective Agents.  
3 **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 2, n. 3, p. 421–436, Sep. 2000.
- 4 SPERA, P. A. et al. IL-10 reduces rat brain injury following focal stroke. **Neuroscience Letters**, v.  
5 251, n. 3, p. 189–92, 31 Jul. 1998.
- 6 SRIRAM, K.; O’CALLAGHAN, J. P. Divergent roles for tumor necrosis factor-alpha in the brain.  
7 **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, v. 2, n. 2, p. 140–53, Jun. 2007.
- 8 STAGLIANO, N. E. et al. The effect of nitric oxide synthase inhibition on acute platelet  
9 accumulation and hemodynamic depression in a rat model of thromboembolic stroke. **Journal**  
10 **of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 17, n. 11, p. 1182–90, Nov. 1997.
- 11 STEPHENSON, D. et al. Transcription factor nuclear factor-kappa B is activated in neurons after  
12 focal cerebral ischemia. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 20, n. 3, p. 592–  
13 603, Mar. 2000.
- 14 STREIT, W. J.; WALTER, S. A.; PENNELL, N. A. Reactive microgliosis. **Progress in Neurobiology**, v.  
15 57, n. 6, p. 563–81, Apr. 1999.
- 16 SUK DANIK, J. et al. Influence of genetic variation in the C-reactive protein gene on the  
17 inflammatory response during and after acute coronary ischemia. **Annals of Human Genetics**,  
18 v. 70, n. Pt 6, p. 705–16, Nov. 2006.
- 19 SUN, Q. et al. 25-Hydroxyvitamin D Levels and the Risk of Stroke: A Prospective Study and  
20 Meta-analysis. **Stroke**, v. 43, n. 6, p. 1470–1477, 2012.
- 21 TRICKLER, W. J.; MAYHAN, W. G.; MILLER, D. W. Brain microvessel endothelial cell responses to  
22 tumor necrosis factor-alpha involve a nuclear factor kappa B (NF-κB) signal transduction  
23 pathway. **Brain Research**, v. 1048, n. 1–2, p. 24–31, 28 Jun. 2005.
- 24 TU, W.-J. et al. Serum 25-hydroxyvitamin D predicts the short-term outcomes of Chinese  
25 patients with acute ischaemic stroke. **Clinical science (London, England : 1979)**, v. 126, n. 5, p.  
26 339–46, Mar. 2014.
- 27 TUTTOLOMONDO, A. et al. Effects of clinical and laboratory variables at admission and of in-  
28 hospital treatment with cardiovascular drugs on short term prognosis of ischemic stroke. The  
29 GIFA study. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 23, n. 7, p. 642–649, Jul.  
30 2013.
- 31 TZIOMALOS, K. et al. Prognostic significance of major lipids in patients with acute ischemic  
32 stroke. **Metabolic Brain Disease**, 2016.
- 33 TZIOMALOS, K. et al. Stress hyperglycemia and acute ischemic stroke in-hospital outcome.  
34 **Metabolism**, v. 67, p. 99–105, Feb. 2017.
- 35 VAN EXEL, E. et al. Inflammation and Stroke: The Leiden 85-Plus Study. **Stroke**, v. 33, n. 4, p.  
36 1135–1138, 1 Apr. 2002.
- 37 VENKAT, P.; CHOPP, M.; CHEN, J. Blood-brain barrier disruption, vascular impairment, and  
38 ischemia/ reperfusion damage in diabetic stroke. **Journal of the American Heart Association**, v.  
39 6, n. 6, p. 1–12, 2017.
- 40 VERMA, S.; SZMITKO, P. E.; RIDKER, P. M. C-reactive protein comes of age. **Nature Clinical**  
41 **Practice Cardiovascular Medicine**, v. 2, n. 1, p. 29–36, 2005.

- 1 VILA, N. et al. Proinflammatory cytokines and early neurological worsening in ischemic stroke.  
2 **Stroke**, v. 31, n. 10, p. 2325–9, Oct. 2000a.
- 3 WANG, D. et al. Fibrates for secondary prevention of cardiovascular disease and stroke.  
4 **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 10, 25 Oct. 2015.
- 5 WANG, J. Y. et al. Vitamin D(3) attenuates 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in rats.  
6 **Brain Research**, v. 904, n. 1, p. 67–75, 2001.
- 7 WANG, Q.; TANG, X. N.; YENARI, M. A. The inflammatory response in stroke. **Journal of**  
8 **Neuroimmunology**, v. 184, n. 1–2, p. 53–68, Mar. 2007.
- 9 WARNER, D. S.; SHENG, H.; BATINIĆ-HABERLE, I. Oxidants, antioxidants and the ischemic brain.  
10 **The Journal of Experimental Biology**, v. 207, n. Pt 18, p. 3221–31, Aug. 2004.
- 11 WATTS, R. N.; PONKA, P.; RICHARDSON, D. R. Effects of nitrogen monoxide and carbon  
12 monoxide on molecular and cellular iron metabolism: mirror-image effector molecules that  
13 target iron. **The Biochemical Journal**, v. 369, n. Pt 3, p. 429–40, 1 Feb. 2003.
- 14 WEINHOLD, B.; RÜTHER, U. Interleukin-6-dependent and -independent regulation of the  
15 human C-reactive protein gene. **The Biochemical journal**, v. 327 ( Pt 2), p. 425–9, 15 Oct. 1997.
- 16 WEIR, C. J. et al. Low Triglyceride, Not Low Cholesterol Concentration, Independently Predicts  
17 Poor Outcome following Acute Stroke. **Cerebrovascular Diseases**, v. 16, n. 1, p. 76–82, 2003.
- 18 WENSLEY, F. et al. Association between C reactive protein and coronary heart disease:  
19 mendelian randomisation analysis based on individual participant data. **BMJ**, v. 342, n. feb15 2,  
20 p. d548–d548, 15 Feb. 2011.
- 21 WOO, P.; KORENBERG, J. R.; WHITEHEAD, A. S. Characterization of genomic and  
22 complementary DNA sequence of human C-reactive protein, and comparison with the  
23 complementary DNA sequence of serum amyloid P component. **The Journal of Biological**  
24 **Chemistry**, v. 260, n. 24, p. 13384–8, 25 Oct. 1985.
- 25 WRIGHTING, D. M.; ANDREWS, N. C. Interleukin-6 induces hepcidin expression through STAT3.  
26 **Blood**, v. 108, n. 9, p. 3204–9, 1 Nov. 2006.
- 27 WU, T.-H. et al. Total white blood cell count or neutrophil count predict ischemic stroke events  
28 among adult Taiwanese: report from a community-based cohort study. **BMC Neurology**, v. 13,  
29 p. 7, Jan. 2013.
- 30 YAN, M. et al. The relationship between gene polymorphism and CRP level in a Chinese Han  
31 population. **Biochemical Genetics**, v. 45, n. 1–2, p. 1–9, 2007.
- 32 YAN, S. et al. Tetramethylpyrazine analogue CXC195 ameliorates cerebral ischemia-reperfusion  
33 injury by regulating endothelial nitric oxide synthase phosphorylation via PI3K/Akt  
34 signaling. **Neurochemistry Research**, v.40, p.446–454, 2015
- 35 YE, Z. et al. GWAS-Supported CRP Gene Polymorphisms and Functional Outcome of Large  
36 Artery Atherosclerotic Stroke in Han Chinese. **NeuroMolecular Medicine**, v. 20, n. 2, p. 225–  
37 232, 2018.
- 38 YU, H. et al. High-sensitivity C-reactive protein in stroke patients – The importance in  
39 consideration of influence of multiple factors in the predictability for disease severity and  
40 death. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 36, p. 12–19, 2017.

- 1 YUAN, B.-B. et al. Variance of Serum Lipid Levels in Stroke Subtypes. **Clinical Laboratory**, v. 61,  
2 n. 10, p. 1509–14, 2015.
- 3 YUN, H. Y.; DAWSON, V. L.; DAWSON, T. M. Neurobiology of nitric oxide. **Critical reviews in**  
4 **Neurobiology**, v. 10, n. 3–4, p. 291–316, Jan. 1996.
- 5 ZAREMBA, J.; SKROBAŃSKI, P.; LOSY, J. Acute ischaemic stroke increases the erythrocyte  
6 sedimentation rate, which correlates with early brain damage. **Folia Morphologica**, v. 63, n. 4,  
7 p. 373–6, Nov. 2004.
- 8 ZHAN, S. et al. Ezetimibe for the prevention of cardiovascular disease and all-cause mortality  
9 events. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 11, p. CD012502, 19 Nov. 2018.
- 10 ZHANG, D. et al. Hyperhomocysteinemia Promotes Inflammatory Monocyte Generation and  
11 Accelerates Atherosclerosis in Transgenic Cystathionine  $\beta$ -Synthase-Deficient Mice.  
12 **Circulation**, v. 120, n. 19, p. 1893–1902, 10 Nov. 2009.
- 13 ZHANG, Y.-B. et al. Association of circulating high-sensitivity C-reactive protein with late  
14 recurrence after ischemic stroke. **NeuroReport**, v. 28, n. 10, p. 598–603, 5 Jul. 2017.
- 15 ZHAO, J. et al. Role of Hyperhomocysteinemia and Hyperuricemia in Pathogenesis of  
16 Atherosclerosis. **Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases**, v. 26, n. 12, p. 2695–2699,  
17 Dec. 2017.
- 18 ZHENG, L. et al. Effects and Mechanism of Action of Inducible Nitric Oxide Synthase on  
19 Apoptosis in a Rat Model of Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury. **The Anatomical Record**, v.  
20 299, n. 2, p. 246–255, Feb. 2016.
- 21 ZHOU, Y. et al. Hs-CRP in stroke: A meta-analysis. **Clinica Chimica acta**, v. 453, p. 21–27, 26  
22 Nov. 2015.
- 23 ZOU, J. Y.; CREWS, F. T. TNF alpha potentiates glutamate neurotoxicity by inhibiting glutamate  
24 uptake in organotypic brain slice cultures: neuroprotection by NF kappa B inhibition. **Brain**  
25 **research**, v. 1034, n. 1–2, p. 11–24, 9 Feb. 2005.

- 1 ANEXOS  
 2 ANEXO 1 – APROVAÇÃO PELO COMITE DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS DA  
 3 UEL

Andamento do projeto - CAAE - 0176.0.268.000-10				
<b>Título do Projeto de Pesquisa</b>				
Resposta inflamatória e imunológica nos pacientes com acidente vascular cerebral e sua correlação com o prognóstico clínico				
<b>Situação</b>	<b>Data Inicial no CEP</b>	<b>Data Final no CEP</b>	<b>Data Inicial na CONEP</b>	<b>Data Final na CONEP</b>
Aprovado no CEP	03/09/2010 16:37:59	18/05/2011 23:42:46		
<b>Descrição</b>	<b>Data</b>	<b>Documento</b>	<b>Nº do Doc</b>	<b>Origem</b>
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

4



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS**  
Universidade Estadual de Londrina  
Registro CONEP 268



<b>Parecer CEP/UEL:</b>	294/2011
<b>CAAE:</b>	0250.0.268.000-11
<b>Processo:</b>	29144.2011.42
<b>Folha de Rosto:</b>	462193
<b>Pesquisador(a):</b>	Edna Maria Vissoci Reiche
<b>Unidade/Órgão:</b>	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><b>"BIOMARCADORES GENÉTICOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO NO ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO: estudo da relevância clínica e da influência no prognóstico dos pacientes"</b></p>	
<p>Situação do Projeto: <b>APROVADO</b></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><b>Prof. Dra. Alexandrina Aparecida Maciel Cardelli</b> Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos Universidade Estadual de Londrina</p>	

5

6

7

1 **APÊNDICE**

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

4

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

8 Prezado (a) Senhor (a):

9

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

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

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

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

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

8 Londrina, \_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_.

9 **Pesquisador Responsável: Dr. Márcio Francisco Lehmann, médico,**  
10 **CRM/PR 16.049. RG 4.481.314-9 SSP/PR, fone: 43 - 9928 5518,**  
11 **e-mail: [mflehmann@hotmail.com](mailto:mflehmann@hotmail.com)**

12  
13 \_\_\_\_\_(nome por extenso do sujeito de pesquisa), tendo sido  
14 devidamente esclarecido sobre os procedimentos da pesquisa, concordo em participar  
15 **voluntariamente** da pesquisa descrita acima.

16 Assinatura (ou impressão dactiloscópica): \_\_\_\_\_

17 Data: \_\_\_\_\_

18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34

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

2

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

6

7 Prezado (a) Senhor (a):

8 Gostaríamos de convidá-lo a participar da pesquisa: **“RESPOSTA INFLAMATÓRIA E IMUNOLÓGICA**

9 **NOS PACIENTES COM ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL ISQUÊMICO AGUDO E SUA RELAÇÃO COM**

10 **O DEFICIT NEUROLÓGICO E EVOLUÇÃO CLÍNICA”**, realizada no Hospital Universitário de Londrina.

11 O objetivo da pesquisa é saber se existe algum exame de sangue que possa indicar de forma mais

12 rápida e simples sinais de que um acidente vascular cerebral (AVC ou derrame no cérebro) tem

13 maiores riscos de evoluir de maneira desfavorável. A sua participação é muito importante e ela se

14 daria da seguinte forma: coleta de amostra de sangue (20 ml) no dia de sua entrada no hospital.

15 Gostaríamos de esclarecer que sua participação é totalmente voluntária, podendo você: recusar-se

16 a participar, ou mesmo desistir a qualquer momento sem que isto acarrete qualquer ônus ou

17 prejuízo à sua pessoa. Informamos ainda que as informações serão utilizadas somente para os fins

18 desta pesquisa e serão tratadas com o mais absoluto sigilo e confidencialidade, de modo a

19 preservar a sua identidade.

20 Solicitamos ainda sua autorização para que após o término do presente estudo, o material de

21 sangue coletado possa ser armazenado, identificado de maneira sigilosa sob a responsabilidade da

22 equipe de pesquisadores, para ser utilizada em futuros estudos sobre os fatores de risco associados

23 ao acidente vascular cerebral a serem desenvolvidos por esta mesma equipe de pesquisadores.

24 Caso não autorize, informamos que o material coletado para este estudo, será descartado após o

25 término da presente pesquisa.

26 Os benefícios esperados são que caso a hipótese da pesquisa seja confirmada, estes resultados

27 poderão agilizar e facilitar os tratamentos disponíveis para um derrame. O sangue que será

28 coletado para a pesquisa será parte da mesma coleta de exames de rotina que será realizada

29 independentemente de sua participação ou não no estudo e desta forma, não vos acarreta em

30 nenhum risco adicional.

31 Informamos que o senhor não pagará nem será remunerado por sua participação. Garantimos, no

32 entanto, que todas as despesas decorrentes da pesquisa serão ressarcidas, quando devidas e

33 decorrentes especificamente de sua participação na pesquisa.

34 Caso você tenha dúvidas ou necessite de maiores esclarecimentos pode nos contatar **Dr. Márcio**

35 **Francisco Lehmann, Av. Robert Koch 60, 3371-2000**, ou procurar o Comitê de Ética em Pesquisa

1 Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, na Avenida Robert Koch, nº 60,  
2 ou no telefone 3371-2490. Este termo deverá ser preenchido em duas vias de igual teor, sendo uma  
3 delas, devidamente preenchida e assinada entregue a você.

4 Londrina, \_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_.

5 **Pesquisador Responsável: Dr. Márcio Francisco Lehmann, médico,**

6 **CRM/PR 16.049. RG 4.481.314-9 SSP/PR.**

7

8

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

12

13 Assinatura (ou impressão dactiloscópica): \_\_\_\_\_

14 Data: \_\_\_\_\_

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

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

2

3 **RESPOSTA INFLAMATORIA E IMUNOLÓGICA NOS PACIENTES COM ACIDENTE VASCULAR**

4 **CEREBRAL E SUA CORRELAÇÃO COM O PROGNÓSTICO CLÍNICO.**

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

6 CAE 0176.0.268.000-10

7 Data de internação \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Horário da coleta \_\_\_\_:\_\_\_\_

8 **IDENTIFICAÇÃO**

9 Nome: \_\_\_\_\_ ID \_\_\_\_\_

10 Idade: \_\_\_\_\_ anos Sexo: ( ) M ( ) F Etnia \_\_\_\_\_

11

12 Antecedentes Mórbitos Pessoais: ( ) HAS ( ) DM

13 ( ) Dislipidemia ( ) Sedentarismo

14 ( ) Dça Autoimune ( ) Dça Hematológica

15 ( ) Dça Infecciosa ( ) AVC ( ) IAM

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

17 Medicamentos de uso contínuo: \_\_\_\_\_

18 ( ) Uso de antioxidantes ( ) Uso de vitaminas Outros \_\_\_\_\_

19

20 Antecedentes Mórbitos Familiares: ( ) HAS ( ) DM ( ) Dislipidemia

21 ( ) AVC ( ) IAM ( ) Outro: \_\_\_\_\_

22

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

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

25 Peso (Kg) \_\_\_\_\_ Altura (m) \_\_\_\_\_

26 Pressão arterial (mmHg) \_\_\_\_\_ Circunferência abdominal (cm) \_\_\_\_\_

27

28 Atividade física:

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

30 ( ) NÃO

31

32

33

34

35

1 **Escala de Rankin Modificada**

2 0- Nenhum sintoma

3 1- Não apresenta incapacidade significativa, apenas sintomas; capaz de realizar as obrigações e  
4 atividades habituais

5 2- Leve incapacidade; incapaz de realizar todas as atividades prévias, porém capaz de realizar os  
6 cuidados consigo próprio sem assistência.

7 3- Moderada incapacidade; necessita alguma ajuda, consegue andar sem ajuda

8 4- Moderada /ou severa incapacidade; incapaz de andar sem assistência e não consegue realizar  
9 sozinho os cuidados consigo próprio

10 5- Incapacidade grave; acamado e sob cuidados constantes de enfermagem, incontinente.

11 6- Morte

12

13 **TOTAL (0-6): \_\_\_\_\_**

14

15