

Vânia Aparecida Mendes Goulart

**ANÁLISE DO PERFILDE AMINOÁCIDOS EM
AMOSTRAS DE PACIENTES COM ACIDENTE
VASCULAR CEREBRAL ISQUÊMICO (AVCI)**

**Instituto de Ciências Biológicas
Belo Horizonte - MG
Setembro/2014**

Vânia Aparecida Mendes Goulart

**ANÁLISE DO PERFILDE AMINOÁCIDOS EM
AMOSTRAS DE PACIENTES COM ACIDENTE
VASCULAR CEREBRAL ISQUÊMICO (AVCI)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular

Orientador: Dr. Rodrigo Ribeiro Resende

Coorientadora: Maria José Nunes de Paiva

**Instituto de Ciências Biológicas
Belo Horizonte - MG
Setembro/2014**



ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE
VÂNIA APARECIDA MENDES GOULART

262/2014/15
entrada
2º/2012
2012777010

Às **quatorze horas** do dia **29 de setembro de 2014**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado de Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "**ANÁLISE DO PERFIL DE AMINOÁCIDOS EM AMOSTRAS DE PACIENTES COM ACIDENTES VASCULAR CEREBRAL ISQUÊMICO (AVCI)**", requisito final para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular, área de concentração: **Biologia Celular**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, **Dr. Rodrigo Ribeiro Resende**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dr. Rodrigo Ribeiro Resende	UFMG	Aprovada
Dra. Lucíola da Silva Barcelos	UFMG	APROVADA
Dra. Karla Simone da Silva Fernandes	Instituto de Pesquisa da Santa Casa - BH	APROVADA

Pelas indicações, a candidata foi considerada: Aprovada
O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 29 de setembro de 2014.**

Dr. Rodrigo Ribeiro Resende (Orientador)

Dra. Lucíola da Silva Barcelos

Dra. Karla Simone da Silva Fernandes

Dustingualino Simões
Prof. Assistente / Coordenador, Pós-graduação
Coordenador do Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular ICB / UFMG

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Rodrigo Ribeiro Resende, pela oportunidade, confiança e estímulo na elaboração e concretização deste trabalho.

À minha coorientadora, Dra. Maria José Nunes de Paiva, pela presteza.

À Dra. Valéria Cristina Sandrim, pelo suporte e doação das amostras utilizadas neste trabalho.

À Dra. Zenilda de Lourdes Cardeal e toda sua equipe do Laboratório de Química Analítica/UFMG, pela disponibilização do laboratório e pelo suporte para realização deste trabalho.

Ao Dr. Reinaldo Francisco Teófilo do Laboratório de Instrumentação e Quimiometria da Universidade Federal de Viçosa, pela colaboração e atenção.

Ao Programa de Pós Graduação em Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, pela oportunidade.

Aos amigos atuais e egressos do Laboratório de Sinalização Celular e Nanotecnologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG: Emerson, Daniel, Anderson, Bruna, Ricardo e Rebecca, pelo apoio e incentivo incondicional.

À minha família e amigos, por terem sido meu porto seguro e pela paciência incondicional em compreender a minha ausência e intranquilidade em busca da realização deste projeto.

APOIO FINANCEIRO

O presente trabalho foi desenvolvido na Universidade Federal de Minas Gerais com os recursos financeiros do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito.
Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.*

(Martin Luther King)

RESUMO

O acidente vascular cerebral (AVC) é a terceira principal causa de morte no mundo, superado apenas pelas doenças cardiovasculares e pelo câncer, e é a principal causa no Brasil. O acidente vascular cerebral isquêmico (AVCI) contribui para aproximadamente 87% dos casos e de acordo com a etiologia pode ser classificado em cinco subtipos: aterotrombótico; cardioembólico; lacunar; de outras etiologias determinadas e AVCI de etiologias indeterminadas (criptogênico). A identificação da causa específica em cada paciente, o diagnóstico precoce e o prognóstico adequado tem importantes implicações clínicas, principalmente no que se refere ao tratamento. O diagnóstico do AVCI é fundamentado basicamente no histórico do paciente e no uso de técnicas de imagem. A tomografia computadorizada (TC) é amplamente utilizada porém é pouco sensível ao AVCI agudo. Já a imagem por ressonância magnética (IRM) possui alta sensibilidade e permite a diferenciação dos subtipos, mas devido ao custo ainda não se encontra disponível na maioria dos hospitais. Até então, não existem biomarcadores de AVCI agudo e crônico que possam complementar os exames clínicos e de imagem. Neste contexto, propomos a investigação do perfil metabólico em amostras de pacientes com AVCI crônico em busca de biomarcadores presentes no sangue periférico, que possam contribuir para o entendimento da fisiopatologia da doença e também para o seu diagnóstico e prognóstico. Para a análise do perfil metabólico investigamos a concentração de dezesseis aminoácidos no plasma de pacientes com algum subtipo de AVCI (n=73) em relação ao grupo controle (n=16), através de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS). Associando os resultados das análises estatísticas multivariadas obtidas pelo método dos mínimos quadrados parcial discriminante (PLS-DA) e pelo método de máquinas de vetores de suporte discriminante (SMV-DA) com o perfil de aminoácidos encontrado através dos testes de *Mann-Whitney*, podemos inferir uma assinatura metabólica para o AVCI formada pelos aminoácidos metionina, alanina, glicina, serina, leucina, prolina, fenilalanina e lisina. Cada subtipo de AVCI também apresentou um perfil característico de aminoácidos em relação ao controle e aos demais subtipos, que também podem ser considerados assinaturas metabólicas. Estes aminoácidos categorizados nestes perfis podem ser considerados biomarcadores em potencial para o AVCI crônico.

PALAVRAS-CHAVE: Acidente vascular cerebral isquêmico. Perfil metabólico. Aminoácidos. Biomarcadores. Biotecnologia. GC-MS.

ABSTRACT

Stroke is the third leading cause of death worldwide, exceeded only by heart disease and cancer, and the leading cause in Brazil. The ischemic stroke (IS) contributes to approximately 87% of the cases and according to the etiology can be classified into five subtypes: atherothrombotic, cardioembolic, lacunar, other etiologies and undetermined etiology (cryptogenic). The identification of specific cause for each patient, early diagnosis and the proper prognosis has important clinical implications, particularly in relation to treatment. The diagnosis of ischemic stroke is based primarily on the patient's history and the use of imaging techniques. Computed tomography (CT) is widely used but little sensitive to acute ischemic stroke. The magnetic resonance imaging (MRI) has high sensitivity and permits the differentiation of the subtypes, but because of the cost is not yet available in most hospitals. Until then, there are no biomarkers of chronic and acute ischemic stroke that can complement clinical and imaging examinations. In this context, we propose to investigate the metabolic profile in samples from patients with ischemic stroke chronic in search of biomarkers in peripheral blood, which may contribute to the pathophysiology of the disease and its diagnosis and prognosis. For the analysis of the metabolic profile investigate the concentration of sixteen amino acids in the plasma of patients with any subtype of ischemic stroke ($n = 73$) compared to the control group ($n = 16$), using gas chromatography coupled to mass spectrometry. Combining the results of multivariate statistical analysis obtained by Partial Least Squares-Discriminant Analysis (PLS-DA) and support vector machines-Discriminant Analysis (SMV-DA) with the amino acid profile found by the Mann-Whitney test, we can infer a metabolic signature for a stroke formed by the amino acids: methionine, alanine, glycine, serine, leucine, proline, phenylalanine and lysine. Each subtype of ischemic stroke also had a characteristic amino acid profile compared to the control and the other subtypes, which may also be considered metabolic signatures. These amino acids categorized these profiles can be considered as potential biomarkers of chronic ischemic stroke.

KEY WORDS: Stroke. Metabolic profile. Amino acids. Biomarkers. Biotechnology. GC-MS.

Lista de ilustrações

- Figura 1. Esquema mostrando núcleo isquêmico e penumbra após AVCI. Enquanto os neurônios do núcleo isquêmico já estão mortos, os neurônios na região de penumbra podem ser recuperados e são potenciais alvos de intervenção terapêutica. Adaptado de Coultrap et al. (2011).22
- Figura 2. Representação da cascata isquêmica. A redução aguda do fluxo sanguíneo causa uma cascata de eventos bioquímicos que culminam na morte neuronal. MMPs= metaloproteinases. Adaptado de Green and Shuaib (2006).....23
- Figura 3. Representação da resposta inflamatória após isquemia. A excitotoxicidade e o estresse oxidativo ativam a micróglia e os astrócitos, de modo que eles passam a secretar citocinas. Estas citocinas conduzem a um aumento da expressão de moléculas de adesão celular pelas células endoteliais, permitindo que as células inflamatórias presentes na circulação sanguínea, principalmente os neutrófilos, se infiltrem na zona cerebral isquêmica. Os neutrófilos também secretam citocinas que promovem uma maior ativação das células gliais. Este ciclo de eventos resulta em morte neuronal. Fonte: Adaptado de Lakhan et al. (2009).27
- Figura 4. AVCI causado por aterosclerose. O acúmulo de placa na artéria carótida interna pode levar ao estreitamento e irregularidade do lúmen da artéria, impedindo o fluxo de sangue adequado para suprir o cérebro. Em alguns casos, pode haver a ruptura da placa inteira ou de pedaços dela, que são levados através da circulação sanguínea até os vasos cerebrais, provocando a obstrução do fluxo sanguíneo e conseqüentemente ao AVCI. Fonte: ADAM, Inc. Disponível em: <http://www.adamimages.com/>29
- Figura 5. AVCI causado por fibrilação atrial (cardioembolia). A fibrilação atrial é um distúrbio grave do ritmo cardíaco. Essa grave arritmia faz com que as duas câmaras superiores do coração (os átrios) tremam ao invés de contrair-se de forma eficaz, o que resulta no mau bombeamento do sangue para fora do átrio. Nesta região, o sangue tende a coagular formando trombos/coágulos. Esses coágulos podem chegar ao cérebro, bloquear uma artéria e interromper o suprimento sanguíneo cerebral, causando o AVCI. Fonte: Adaptado de Ruff (2012).30

Figura 6. AVCI lacunar. Imagens do cérebro de um paciente hipertenso, com AVCI lacunar, obtidas através de imagem por ressonância magnética. Identificação de uma única lacuna no membro posterior da cápsula interna esquerda (setas brancas), causada por embolia. A = Ressonância magnética ponderada em difusão (em inglês: *Diffusion-weighted imaging*, sigla DWI) e B= Ressonância magnética usando fluído-atenuadas sequências de recuperação de inversão (em inglês: *Fluid-attenuated inversion recovery*, sigla: FLAIR). Fonte: Gunda et al. (2009).31

Figura 7. Esquema do fluxo de trabalho em metabolômica. Fonte: Adaptado de Patti et al. (2012) e Koek et al. (2011).42

Figura 8. Esquema representando os componentes básicos de um cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas. Adaptado de Shalaby (2013).47

Figura 9. Estrutura geral de um aminoácido. Esta estrutura é comum a todos os α -aminoácidos, com exceção da prolina que é um aminoácido cíclico. O grupo R ou cadeia lateral é diferente em cada aminoácido, dando propriedades específicas a cada um deles. Adaptado de Nelson and Cox (2008).48

Figura 10. Representação esquemática de uma matriz de dados para análise por PLS-DA. Cada coluna da matriz X corresponde a um vetor. Os valores representados são meramente ilustrativos.61

Figura 11. Formação do hiperplano de separação através dos vetores de suporte. Neste exemplo esquemático, o SVM-DA encontra um único hiperplano como uma margem de separação máxima denotada por δ . A linha H1 define a fronteira para os objetos da classe +1, enquanto H2 define a fronteira para os objetos da classe -1. Os objetos que estão na fronteira, marcados em laranja e azul, são denominados vetores de suporte.62

Figura 12. Cromatograma. Exemplo de perfil cromatográfico obtido pela análise de uma amostra de plasma de paciente com AVCI, demonstrando a presença de 16 aminoácidos. (1) Alanina; (2) Glicina; (3) Sarcosina; (4) Valina; (5) Leucina; (6) Isoleucina; (7) Serina; (8) Treonina; (9) Metionina; (10) Prolina; (11) Ácido aspártico; (12) Cisteína; (13) Ácido

glutâmico; (14) Fenilalanina; (15) Asparagina; e (16) Lisina. Eixo "x" corresponde ao tempo em minutos e o eixo "y" corresponde à intensidade. 64

Figura 13. Representação esquemática do metabolismo da prolina (PRO). O primeiro passo para a degradação de prolina é sua conversão em Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato (P5C), pela enzima prolina oxidase (POX). P5C pode ser reduzido novamente a prolina por P5C-redutase (P5CR) ou pode ser convertido para o glutamato (ou ácido glutâmico) pela enzima, pirrolina-5-carboxilato de desidrogenase (P5CD) e pode entrar no ciclo do TCA, ou alternativamente ele pode ser convertido em ornitina pela ornitina aminotransferase (OAT) e pode entrar no ciclo da ureia. Adaptado de Pandhare et al. (2009). 66

Figura 14. Modelo hipotético do ciclo "leucina-ácido glutâmico" no cérebro. De acordo com este modelo putativo, a leucina presente no sangue periférico é rapidamente transportada para dentro dos astrócitos, onde é transaminada com 2-oxo-glutarato (2-KG) para formar ácido glutâmico e 2-oxo-cetoisocaproato (KIC), o cetoácido de leucina. O ácido glutâmico é convertido em glutamina via glutamina sintetase astrocítica. Nos neurônios, a glutamina é convertida em ácido glutâmico. O KIC também é liberado para os neurônios, onde poderá ser transaminado com o ácido glutâmico para produzir leucina. Esta última é transportada de volta para os astrócitos, completando o ciclo funcional. Fonte: Adaptado de Daikhin and Yudkoff (2000). 67

Figura 15. Boxes 1-16: representação gráfica da comparação dos níveis de aminoácidos presentes nas amostras de AVCI e grupo controle através do teste de Mann-Whitney. Foram considerados estatisticamente significantes as diferenças cujo $p < 0,05$ (em vermelho). 80

Figura 16. Representação gráfica da separação obtida entre amostras de AVCI do subtipo aterotrombótico *versus* controles, através dos modelos construídos por PLS-DA-OPS (A) e SVM-DA-OPS (B). 82

Figura 17. Representação gráfica da separação obtida entre amostras de AVCI do subtipo cardioembólico *versus* controles e cardioembólico *versus* os demais subtipos através dos modelos construídos por PLS-DA-OPS (A e B). Tabela 5. Dados estatísticos dos modelos construídos para o subtipo de AVCI cardioembólico (CARD) *versus* controles (CONT) e cardioembólico *versus* os demais subtipos (SUBT). As variáveis (aminoácidos) que

apresentaram maior contribuição para a separação das classes estão listadas na última coluna da tabela, na ordem do seu nível de importância. Os modelos plotados em gráficos estão marcados em vermelho na tabela e apresentados na figura 16. 83

Figura 18. Representação gráfica da separação obtida entre amostras de AVCI do subtipo lacunar *versus* controles e lacunar *versus* os demais subtipos, através dos modelos construídos por PLS-DA-OPS (A) e PLS-DA-FULL(B). 84

Figura 19. Representação gráfica da separação obtida entre amostras de AVCI do subtipo indeterminado *versus* controles (A) por SVM-DA-OPS, e indeterminado *versus* os demais subtipos por PLS-DA-FULL (B). 85

Figura 20. Representação gráfica da separação obtida entre amostras controles *versus* todos os subtipos de AVCI por SVM-DA-OPS. Tabela 8. Dados estatísticos dos modelos construídos para as amostras controles (CONT) *versus* os demais subtipos de AVCI (SUBT). As variáveis (aminoácidos) que apresentaram maior contribuição para a separação das classes estão listadas na última coluna da tabela, na ordem do seu nível de importância. O modelo plotado em gráfico está marcado em vermelho na tabela e apresentado na figura 19. 86

Lista de Tabelas e Quadros

- Tabela 1. Dados demográficos do grupo de estudos56
- Tabela 2. Tempo de retenção, íons (m/z) e abundância específicos para cada L-aminoácido .59
- Tabela 3. Concentração de aminoácidos ($\mu\text{mol/L}$) encontrados em amostras de AVCI através da técnica de GC-MS..... 71
- Tabela 4. Dados estatísticos dos modelos construídos para o subtipo de AVCI aterotrombótico (ATERO) *versus* controles (CONT) e aterotrombótico *versus* os demais subtipos (SUBT). As variáveis (aminoácidos) que apresentaram maior contribuição para a separação das classes estão listadas na última coluna da tabela, na ordem do seu nível de importância. Os modelos plotados em gráficos estão marcados em vermelho na tabela e apresentados na figura 15.82
- Figura 17. Representação gráfica da separação obtida entre amostras de AVCI do subtipo cardioembólico *versus* controles e cardioembólico *versus* os demais subtipos através dos modelos construídos por PLS-DA-OPS (A e B). Tabela 5. Dados estatísticos dos modelos construídos para o subtipo de AVCI cardioembólico (CARD) *versus* controles (CONT) e cardioembólico *versus* os demais subtipos (SUBT). As variáveis (aminoácidos) que apresentaram maior contribuição para a separação das classes estão listadas na última coluna da tabela, na ordem do seu nível de importância. Os modelos plotados em gráficos estão marcados em vermelho na tabela e apresentados na figura 16..... 83
- Tabela 6. Dados estatísticos dos modelos construídos para o subtipo de AVCI lacunar (LAC) *versus* controles (CONT) e lacunar *versus* os demais subtipos (SUBT). As variáveis (aminoácidos) que apresentaram maior contribuição para a separação das classes estão listadas na última coluna da tabela, na ordem do seu nível de importância. Os modelos plotados em gráficos estão marcados em vermelho na tabela e apresentados na figura 17.84
- Tabela 7. Dados estatísticos dos modelos construídos para o subtipo de AVCI indeterminado (IND) *versus* controles (CONT) e indeterminado *versus* os demais subtipos (SUBT). As variáveis (aminoácidos) que apresentaram maior contribuição para a separação das classes

estão listadas na última coluna da tabela, na ordem do seu nível de importância. Os modelos plotados em gráficos estão marcados em vermelho na tabela e apresentados na figura 18. 85

Figura 20. Representação gráfica da separação obtida entre amostras controles *versus* todos os subtipos de AVCI por SVM-DA-OPS. Tabela 8. Dados estatísticos dos modelos construídos para as amostras controles (CONT) *versus* os demais subtipos de AVCI (SUBT). As variáveis (aminoácidos) que apresentaram maior contribuição para a separação das classes estão listadas na última coluna da tabela, na ordem do seu nível de importância. O modelo plotado em gráfico está marcado em vermelho na tabela e apresentado na figura 19. 86

Quadro 1. Classificação dos aminoácidos. 50

Lista de abreviaturas e siglas

AVC Acidente Vascular Cerebral

AVCI Acidente Vascular Cerebral Isquêmico

GC-MS Cromatografia gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas; *Gas chromatography-mass spectrometry*

IRM Imagem por Ressonância Magnética

TOAST *Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment*

ATP Adenosina trifosfato

NMDA N-metil-D-aspartato

AMPA Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolopropiônico

ADP Adenosina difostato

EROs Espécies reativas de oxigênio

TC Tomografia Computadorizada

TEP Tomografia por Emissão de Pósitrons

SBDC Sociedade Brasileira de Doenças Cerebrovasculares

ASA *American Stroke Association*

EUSI *European Stroke Initiative*

FDA *Food and Drug Administration*

AIT Ataque Isquêmico Transitório

t-PA Trombolítico Ativador do Plasminogênio

LC-MS Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas; *Liquid chromatography-mass spectrometry*

UPLC-TOF-MS cromatografia líquida de alta performance acoplada ao espectrômetro de massas com analisador do tipo tempo de voo; *ultra-performance liquid chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry*

NRM Ressonância magnética nuclear; *Nuclear magnetic resonance spectroscopy*

MMP-9 Matriz Metaloproteinase-9

VCAM Molécula de Adesão Celular Vascular

PCA Análise de Componentes Principais; *Principal Component Analysis*

PLS-DA Método dos Mínimos Quadrados Parcial Discriminante; *Partial Least Squares-Discriminant Analysis*

SVM-DA Método de Máquinas de Vetores de Suporte Discriminante; *Support vector machines-Discriminant Analysis*

BSTFA N, O-bis-(trimetilsilil)trifluoacetamida

ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária

INMETRO Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

HMDB *Human Metabolome Database*

GABA Ácido γ -aminobutírico

NCBI *National Center for Biotechnology Information*

PAH Fenilalanina hidroxilase

DBrT 3,5- dibromo-L-tirosina

DIT 3,5- diiodo-L-tirosina

BH4 tetrahidrobiopterina

MAT metionina-adenosiltransferase

SAMe S-adenosilmetionina

RMSECV Raiz do erro quadrático médio de validação cruzada; *Root mean square error of cross-validation*

OPS Seleção dos preditores ordenados; *Ordered Prediction Selection*

Conteúdo

1 INTRODUÇÃO.....	21
1.1 Acidente Vascular Cerebral Isquêmico (AVCI).....	21
1.2 Patofisiologia do AVCI.....	21
1.3 Subtipos de AVCI.....	27
1.3.1 Aterotrombótico	27
1.3.2 Cardioembólico	29
1.3.3 Lacunar	30
1.3.4 Indeterminado ou criptogênico.....	32
1.3.5 Outras etiologias determinadas.....	33
1.4 Fatores de Risco	33
1.5 Sinais, diagnóstico e tratamento	34
1.6 Biomarcadores de AVCI	37
2. METABOLÔMICA	39
2.1 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS)	43
3. AMINOÁCIDOS: metabolismo e funções no cérebro.....	47
4.JUSTIFICATIVA	52
5 OBJETIVOS.....	54

5.1 Objetivo geral	54
5.2 Objetivos específicos	54
6 METODOLOGIA.....	55
6.1 Grupo de estudos	55
6.2 Extração dos aminoácidos das amostras de plasma.....	56
6.3 Derivatização das amostras	57
6.4 Condições cromatográficas e de espectrometria de massas	57
6.5 Identificação e quantificação dos aminoácidos	58
6.6 Análises estatísticas	60
7 RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
7.1 Concentração de aminoácidos em amostras de plasma de pacientes com AVCI.....	63
7.2 Identificação dos subtipos de AVCI e potenciais biomarcadores através de análise estatística multivariada	80
8 CONCLUSÃO.....	87
PERSPECTIVAS FUTURAS.....	88
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
APÊNDICE	106
Apêndice A - TCLE paciente	106
Apêndice B - TCLE responsável	108

Apêndice C - TCLE controles	110
Apêndice D - Coeficientes angulares obtidos através das curvas de calibração e valores da massa molar dos aminoácidos	112
Apêndice E - Valores das áreas dos picos encontradas para os aminoácidos	113
ANEXOS	115
Anexo A -Parecer consubstanciado do CEP da UFMG	115
Anexo B - Parecer Consubstanciado do CEP da SCMBH	118

1 INTRODUÇÃO

1.1 Acidente Vascular Cerebral Isquêmico (AVCI)

O acidente vascular cerebral (AVC) é a terceira principal causa de morte nos países desenvolvidos, sendo superado apenas pelas doenças cardiovasculares e pelo câncer, e é considerada a principal causa de invalidez permanente (Mackay J, 2004, Montaner et al., 2008). A cada ano, aproximadamente 795.000 pessoas no mundo são acometidas por um AVC (Yoo et al., 2011). Cerca de 610.000 desses casos são primeiros ataques e 185.000 são ataques recorrentes (Roger et al., 2011, Go et al., 2013). Em 2002, o último ano com estatísticas oficiais de saúde disponíveis sobre o AVC no Brasil, considerando todas as causas de mortes, ele foi a principal causa de mortalidade chegando a aproximadamente 87.344 mortes (Lotufo, 2005).

O AVC pode ser definido como um déficit neurológico súbito motivado por isquemia ou hemorragia no sistema nervoso central (Kaul and Munshi, 2012). O acidente vascular cerebral causado por isquemia (AVCI) contribui para aproximadamente 87% dos casos, sendo causado por uma oclusão vascular localizada, levando à interrupção do fornecimento de oxigênio e glicose ao tecido cerebral, afetando subsequentemente os processos metabólicos da região envolvida (Lakhan et al., 2009).

Atualmente, o sistema TOAST (*Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment*) de classificação diagnóstica é amplamente utilizado e distingue o AVCI, com base na etiologia, em cinco subtipos: aterosclerose de grandes artérias (aterotrombótico); cardioembolismo (cardioembólico); oclusão de pequenas artérias (lacunar); AVCI de outras etiologias determinadas (indeterminado) e AVCI de etiologias indeterminadas (criptogênico) (Adams et al., 1993, Altieri et al., 2009, Chen et al., 2012).

1.2 Patofisiologia do AVCI

Todos os subtipos de AVCI ocorrem como resultado da interrupção aguda do fluxo sanguíneo arterial, conseqüentemente, da depleção de oxigênio e nutrientes. Poucos segundos/minutos após esta interrupção, na região cerebral afetada, inicia-se uma cascata de eventos bioquímicos que se sobrepõem, denominada cascata isquêmica. Esta seqüência de

eventos redundantes culminam na perda de tecido cerebral por seis mecanismos principais: excitotoxicidade, desequilíbrio iônico, estresse oxidativo e nitrosativo, apoptose e inflamação (Lo et al., 2003, Lakhan et al., 2009).

A zona central do tecido isquêmico é definida como núcleo isquêmico e nesta região o fornecimento de glicose e oxigênio é completamente suprimido de forma crítica e irreversível, de modo que a lesão neuronal é iniciada dentro de poucos minutos. Em torno do núcleo necrosado, o parênquima cerebral recebe um fornecimento de sangue diminuído através de vasos colaterais cerebrais e do fluxo residual arterial. Esta região é definida como penumbra isquêmica e pode ser regenerada se o fluxo sanguíneo arterial for rapidamente restaurado, sendo portanto o principal alvo das intervenções terapêuticas do AVCI (**Fig.1**) (Thurman and Jauch, 2002). Embora o fluxo sanguíneo nesta região seja muito baixo para permitir a atividade elétrica, os canais iônicos ainda permanecem preservados. No entanto, dentro de pouco tempo sem tratamento, esta zona é submetida a uma onda de processos metabólicos deletérios propagadas a partir do núcleo, que conduzirá a expansão do núcleo isquêmico e a perda de uma área cerebral maior (Weir, 2008).

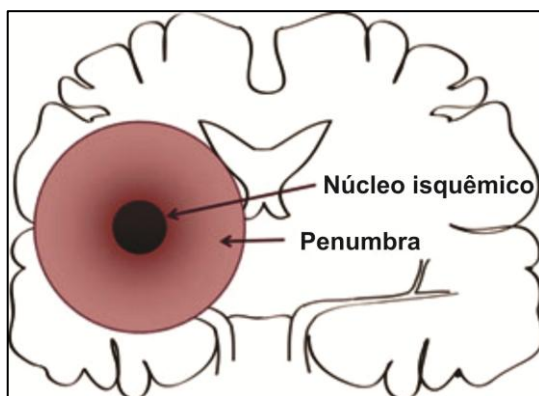


Figura 1. Esquema mostrando núcleo isquêmico e penumbra após AVCI. Enquanto os neurônios do núcleo isquêmico já estão mortos, os neurônios na região de penumbra podem ser recuperados e são potenciais alvos de intervenção terapêutica. Adaptado de Coultrap et al. (2011).

O cérebro é um órgão que possui alta demanda metabólica e energética. Sob condições normais, o metabolismo aeróbico é a maior fonte de energia para o cérebro. Embora o peso do cérebro humano seja de apenas cerca de 2% do peso corporal total, ele utiliza cerca de 20% de oxigênio e 25% da glicose consumida pelo corpo todo. Mais de 90% do oxigênio consumido pelo cérebro é utilizado pelas mitocôndrias para gerar ATP (Adenosina trifosfato), sua principal fonte de energia (Zauner et al., 2002). Essa energia é produzida quando a glicose

é oxidada gerando CO_2 e água, e é usada em sua maior parte para manter as bombas iônicas Na^+/K^+ ATPases presentes nas membranas plasmáticas neuronais funcionando, mantendo os gradientes iônicos. Estas bombas de íons mantêm a concentração intracelular de K^+ elevado e baixa concentração intracelular de Na^+ necessários para a propagação do potencial de ação (Doyle et al., 2008). Durante a isquemia, a inibição da síntese de ATP mitocondrial leva ao consumo de todo ATP presente nas células dentro de aproximadamente dois minutos, o que provoca a despolarização das membranas plasmáticas neuronais e das células da glia, a liberação do K^+ para o espaço extracelular e a entrada de Na^+ , Cl^- e água para as células. Além do desequilíbrio osmótico e iônico, a despolarização da membrana também ativa os canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes, provocando a liberação de neurotransmissores. Os níveis de Ca^{2+} intracelulares podem subir para 50-100 mM, sendo que em condições normais a concentração é cerca de 1,2 mM. Este rápido aumento do cálcio intracelular se deve ao influxo através da membrana e também da liberação do Ca^{2+} presentes nas mitocôndrias e no retículo citoplasmático. O excesso de Ca^{2+} citosólico causa a ativação de proteases cálcio-dependentes, fosfolipases, lipases, ATPases e endonucleases. A ativação dessas enzimas altera a função celular, desestabiliza a estrutura da membrana plasmática e do citoesqueleto, aumenta a lipólise pelo metabolismo de ácidos graxos livres, induz a produção de radicais superóxido; promovendo danos ao DNA, e por fim, levam à morte celular (**Fig.2**). (Longstaff, 2005, Ohtaki et al., 2005, Doyle et al., 2008).

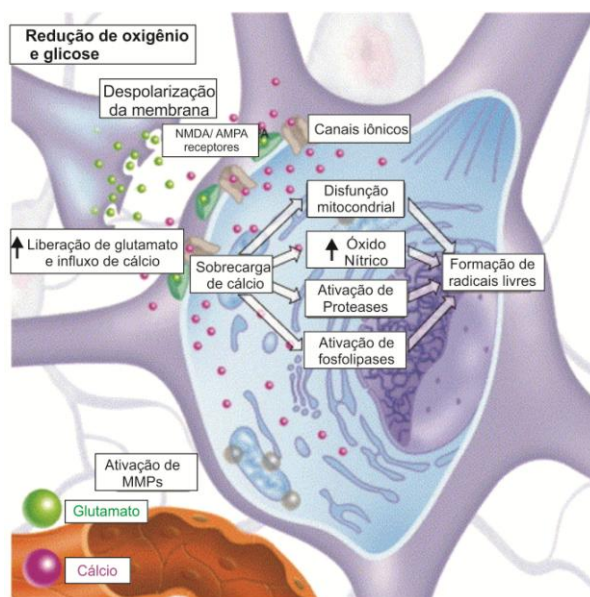


Figura 2. Representação da cascata isquêmica. A redução aguda do fluxo sanguíneo causa uma cascata de eventos bioquímicos que culminam na morte neuronal. MMPs= metaloproteinases. Adaptado de Green and Shuaib (2006).

Dentre os principais eventos deletérios causados pela despolarização da membrana celular podemos destacar a excitotoxicidade, causada principalmente pela liberação de aminoácidos excitotóxicos para o meio extracelular, havendo uma liberação massiva do neurotransmissor excitatório glutamato (ou ácido glutâmico) pelos neurônios glutaminérgicos. O ácido glutâmico possui um papel central na patologia isquêmica (Coyle and Puttfarcken, 1993). A liberação excessiva do glutamato ocorre, basicamente, devido à despolarização da membrana e ao acúmulo de Na^+ intracelular que causa a reversão dos transportadores de ácido glutâmico, permitindo a sua saída ao longo do seu gradiente de concentração (Lo et al., 2003, Doyle et al., 2008). Os efeitos causados pelo aumento na concentração de ácido glutâmico na fenda sináptica, uma vez não sendo possível sua recaptção, é a ativação dos receptores extracelulares ionotrópicos excitatórios N-metil-D-aspartato (NMDA) e ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolopropiônico (AMPA). Os receptores NMDA são permeáveis ao Ca^{2+} e a abertura desses canais leva ao aumento da despolarização da membrana plasmática e do influxo de cálcio, exacerbando a sobrecarga de Ca^{2+} intracelular (Ohtaki et al., 2005, Kunz et al., 2010). Os receptores AMPA normalmente não são permeáveis ao Ca^{2+} , entretanto, em situações de isquemia sua subunidade GluR2, responsável pela impermeabilidade, é endocitada e há uma regulação negativa dos mRNAs de GluR2. Sem a subunidade GluR2, os receptores AMPA passam a ser muito permeáveis ao Ca^{2+} , sendo que o aumento da permeabilidade destes receptores contribuem ainda mais para a morte celular causada pelo excesso de Ca^{2+} (Liu et al., 2006).

O aumento de Ca^{2+} , Na^+ e ADP (Adenosina difosfato, resultante do ATP desfosforilado) intracelular levam as mitocôndrias a produzir níveis deletérios de espécies reativas de oxigênio (EROs), também chamados de radicais livres, tais como, superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila, causando o estresse oxidativo e nitrosativo (Kunz et al., 2010). Ao contrário de outros órgãos, o cérebro é especialmente vulnerável à espécies reativas de oxigênio, devido a presença de grande quantidade de ácidos graxos insaturados, grande reserva de ferro, alta taxa de metabolismo de oxigênio pelo fato dos neurônios possuírem relativamente baixos níveis de antioxidantes endógenos (Coyle e Puttfarcken, 1993). EROs são capazes de causar danos celulares por destruição das membranas celulares, por clivagem do DNA, pela oxidação de proteínas formando derivados contendo grupos carbonila e nitração de biomoléculas (como a tirosina), pelo bloqueio da respiração

mitocondrial, além de ativar vias de sinalização que resultam na morte celular por apoptose (Chong et al., 2004, Doyle et al., 2008).

A perda de integridade da membrana e organelas são os mecanismos mais importantes de morte celular em condições de isquemia. Entretanto, têm sido observados mecanismos que levam a morte celular por apoptose, principalmente dentro da região de penumbra (Lo et al., 2003). Nesta região, ainda existe uma baixa produção de ATP, logo, a neurodegeneração é gradual e há o predomínio da morte celular por apoptose, que é um processo dependente de ATP (Akpan and Troy, 2013). A lesão isquêmica leve induz preferencialmente a morte celular por um processo semelhante ao da apoptose, e não por necrose, embora o termo "aponecrose" descreveria mais adequadamente a patologia. O tipo, a idade e a localização de células do cérebro tornam essas células mais ou menos resistentes à apoptose ou necrose (Yuan and Yankner, 2000, Doyle et al., 2008). Em um estudo desenvolvido por Martin et al. (1998) foi demonstrado que a neurodegeneração excitotóxica não têm que ser rigorosamente apoptótica ou necrótica, de acordo com uma classificação tradicional binária de morte celular, mas pode existir como formas intermédias ou híbridas de morte celular que se encontram ao longo de uma série contínua estrutural com a apoptose e necrose nos extremos. Esta continuidade é influenciada pelo subtipo de receptor de ácido glutâmico que é ativado, portanto, a morte neuronal excitotóxica não é idêntica em todos os neurônios. Possivelmente, isso se deve à elevada diversidade na expressão, localização e função dos subtipos de receptores de ácido glutâmico e de sistemas de segundo mensageiro. A apoptose, ao contrário da necrose, é considerada um mecanismo neuroprotetor, impedindo que a neurodegeneração ocorra prolongadamente e por uma maior extensão de tecido (Kihara et al., 2010, Paschon et al., 2012).

Mecanismos de morte celular programada dependentes e independentes de caspases têm sido descritos em condições isquêmicas (Ferrer and Planas, 2003, Akpan and Troy, 2013). As caspases pertencem a uma família de cisteína aspartases (proteases que possuem um resíduo de cisteína e são capazes de clivar outras proteínas após um resíduo de ácido aspártico), são constitutivamente expressas em células de cérebro adulto e especialmente em recém-nascidos, particularmente nos neurônios. Essas enzimas são clivadas e ativadas de forma sequencial por estímulos extrínsecos ou intrínsecos das células. A morte celular dependente de caspases utiliza energia na forma de ATP (Yuan and Yankner, 2000, Ferrer et al., 2003). Devido ao declínio rápido do suprimento de ATP após a isquemia grave, a morte

celular por necrose é predominante, principalmente na região do núcleo. Embora, normalmente a isquemia e a depleção de ATP causem um edema celular agudo, desequilíbrios iônicos também podem desencadear o encolhimento celular e a morte por apoptose, sob certas condições (Nicotera et al., 2000). Além disso, o efluxo de K^+ através do receptor NMDA induz a contração celular, aumenta a atividade das caspases e aumenta a apoptose em neurônios cultivados quando as concentrações extracelulares de Na^+ e Ca^{2+} estão reduzidas. Deste modo, existem mecanismos comuns entre a excitotoxicidade mediada por ácido glutâmico e os programas que levam à apoptose. Gatilhos apoptogênicos incluem a formação excessiva de EROs, ativação de receptores de morte programada (CD95 e TRAIL), danos no DNA, e possivelmente a ativação de proteases lisossomais (Martin-Villalba et al., 1999, Nicotera et al., 2000, Lo et al., 2003).

O papel que a inflamação desempenha durante a isquemia cerebral vem sendo muito discutido. Experimentalmente e clinicamente, a lesão isquêmica cerebral está associada com uma resposta inflamatória aguda e prolongada, caracterizada pela ativação de células gliais residentes, produção de citocinas inflamatórias, bem como a infiltração de leucócitos no cérebro (Kriz and Lalancette-Hebert, 2009). O efeito dos componentes individuais da cascata inflamatória podem ser benéficos dependendo da fase de lesão do tecido, a magnitude da resposta e, se o componente inflamatório também ativa as vias neuroprotetoras. Entretanto, os eventos inflamatórios, em determinadas circunstâncias, podem contribuir para agravar a lesão isquêmica. Ainda é controverso o papel da inflamação no AVCI, não se sabe até que ponto é benéfico ou deletério (Kriz, 2006, Doyle et al., 2008). Na fase aguda do AVCI (minutos a horas), EROs e mediadores pró-inflamatórios (citocinas e quimiocinas) são liberados rapidamente do tecido lesionado. Estes mediadores induzem a expressão das moléculas de adesão em células endoteliais cerebrais e em leucócitos e assim, promovem a adesão e a migração transendotelial de leucócitos circulantes (**Fig. 3**). Na fase subaguda (horas ou dias), leucócitos infiltrados liberam citocinas e quimiocinas, e a produção excessiva de EROs leva à indução/ativação de metaloproteinases da matriz (principalmente MMP-9), que amplificam a resposta inflamatória do cérebro ainda mais, fazendo com que ocorra a amplificação da ativação de células residentes e infiltração de leucócitos (Lakhan et al., 2009, Jin et al., 2010a). Este processo leva ao rompimento da barreira hematoencefálica, edema cerebral, morte neuronal, e transformação hemorrágica (Wang et al., 2007). No entanto, muitos destes fatores pró-inflamatórios desempenham um papel duplo em fases precoces e tardias de

acidente vascular cerebral. Por exemplo, independentemente da origem celular, foi demonstrado que a MMP-9 no início da lesão cerebral isquêmica atua de forma prejudicial, mas pode promover a regeneração do cérebro e a remodelação neurovascular numa fase posterior de reparação (Coull, 2007, Amantea et al., 2009).

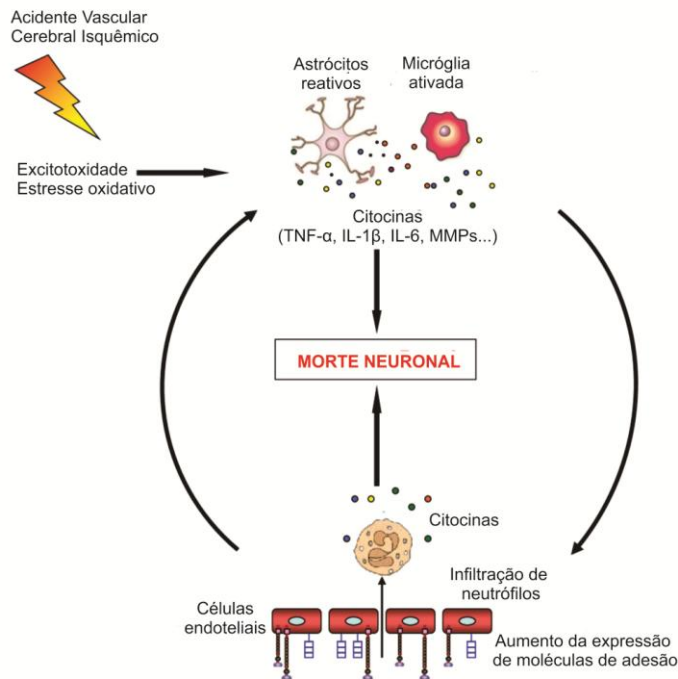


Figura 3. Representação da resposta inflamatória após isquemia. A excitotoxicidade e o estresse oxidativo ativam a micróglia e os astrócitos, de modo que eles passam a secretar citocinas. Estas citocinas conduzem a um aumento da expressão de moléculas de adesão celular pelas células endoteliais, permitindo que as células inflamatórias presentes na circulação sanguínea, principalmente os neutrófilos, se infiltrem na zona cerebral isquêmica. Os neutrófilos também secretam citocinas que promovem uma maior ativação das células gliais. Este ciclo de eventos resulta em morte neuronal. Fonte: Adaptado de Lakhan et al. (2009).

1.3 Subtipos de AVCI

1.3.1 Aterotrombótico

A doença aterosclerótica das artérias cervical e intracraniana é a causa mais frequente de AVCI sendo responsável por cerca de 48% dos casos (Palomeras Soler and Casado Ruiz, 2010). A aterosclerose é caracterizada pelo espessamento e perda de elasticidade da parede do vaso sanguíneo e subsequente formação de placas (ateromas). As lesões ateroscleróticas desenvolvem-se como resultado de estímulos inflamatórios, liberação de diversas citocinas,

proliferação de células musculares lisas, calcificação, síntese de matriz do tecido conjuntivo e acúmulo de macrófagos e lipídios (Crowther, 2005). De acordo com a capacidade de se romper do local da lesão, as placas ateroscleróticas são classificadas em estáveis e vulneráveis. As placas vulneráveis consistem de um núcleo trombogênico rico em lipídeos, que é separado da corrente sanguínea arterial apenas por uma camada fina e frágil de tecido, denominado cápsula fibrosa (Cullen et al., 2003). Embora a causa exata da ruptura dessas placas ainda não tenha sido elucidada, têm sido demonstrado através de estudos patológicos que placas com grandes núcleos de lipídeos, com capas fibrosas finas, inflamação proeminente na região da capa e necrose na região do núcleo, e uma escassez de células musculares lisas e de colágeno são mais propensas à ruptura (Davies et al., 1993, Finn et al., 2010, Fishbein, 2010).

A aterosclerose pode levar ao AVCI por vários mecanismos incluindo falência hemodinâmica, trombose *in situ* por ruptura da placa, tromboembolismo distal ou oclusão de ramos perforantes da artéria principal (**Fig.4**) (Yousef Mohammad, 2010). Nas artérias cerebrais média basilar e proximal, o AVCI pode resultar de uma oclusão de pequenos vasos devido ao crescimento lento de uma placa estável no vaso principal. Placas de crescimento lento e estáveis também podem causar isquemia cerebral por estenose e hipoperfusão sem tromboembolismo (Rothwell, 2007).

A aterosclerose é o principal fator etiológico para o AVCI e para o ataque isquêmico transitório (AIT), que é frequentemente definido como um episódio de disfunção neurológica causada por isquemia cerebral focal com recuperação completa dentro de 24 horas (Gupta et al., 2014). A doença aterosclerótica em artérias de pequeno calibre podem causar infartos lacunares. Já o AVCI causado por embolismo cardiogênico, que ocorre mais comumente em pacientes com fibrilação atrial, é muitas vezes resultado indireto de doença cardíaca isquêmica secundária à aterosclerose (Benbir et al., 2007).

O tratamento para AVCI causado por aterosclerose de grandes artérias, dependendo do grau de estenose, é realizado através da endarterectomia (tratamento cirúrgico que consiste na remoção da placa) e o tratamento para evitar recidivas é realizado com aspirina (Ocava et al., 2006, Donnan et al., 2008). Dentre os fatores de risco que contribuem para a progressão da aterosclerose e conseqüentemente para o AVCI, podemos citar a hipertensão arterial, tabagismo, diabetes e dislipidemia (Adams, 2009).

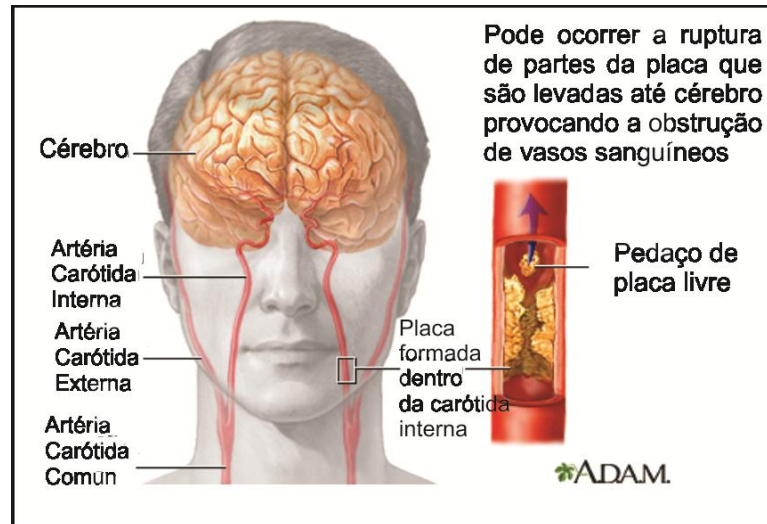


Figura 4. AVCI causado por aterosclerose. O acúmulo de placa na artéria carótida interna pode levar ao estreitamento e irregularidade do lúmen da artéria, impedindo o fluxo de sangue adequado para suprir o cérebro. Em alguns casos, pode haver a ruptura da placa inteira ou de pedaços dela, que são levados através da circulação sanguínea até os vasos cerebrais, provocando a obstrução do fluxo sanguíneo e consequentemente ao AVCI. Fonte: ADAM, Inc. Disponível em: <http://www.adamimages.com/>

1.3.2 Cardioembólico

O cardioembolismo é a segunda principal causa de AVCI ocasionando cerca de 15-30% dos casos (Arboix and Alio, 2012). Um grande número de condições cardíacas tem sido propostas como fontes potenciais de embolia, dentre elas, são consideradas de alto risco para o AVCI a fibrilação atrial, estenose mitral, válvulas mecânicas protéticas, infarto recente do miocárdio, trombo atrial ou ventricular esquerdo, mixoma atrial, endocardite infecciosa, cardiomiopatia dilatada, endocardite trombótica não bacteriana e aneurisma ventricular (Murtagh and Smalling, 2006).

A fibrilação atrial é uma arritmia cardíaca sustentada, sendo considerada a principal causa do AVCI do subtipo cardioembólico. A arritmia provoca a contração inadequada da musculatura cardíaca levando à estase sanguínea no átrio esquerdo (**Fig.5**), que por sua vez, predispõe a formação de trombos especialmente na aurícula esquerda, levando ao aumento da taxa de embolização cerebral (Di Tullio and Homma, 2002, Ruff, 2012). A estase sanguínea está associada como o aumento das concentrações de fibrinogênio, D-dímero e fator de von Willebrand, que são indicativos de um estado trombótico (Arboix and Alio, 2010, Garcia-Berrocso et al., 2010). O AVCI cardioembólico devido à fibrilação atrial normalmente

requer tratamento com anticoagulantes orais como a varfarina ou aspirina para diminuir o risco de recorrência (McCabe and Rakhit, 2007, Kirshner, 2010).

A recorrência de AVCI cardioembólico é comum entre 6% a 12% dos pacientes e pode ocorrer dentro de duas semanas após o primeiro evento. No entanto, em muitos casos, as técnicas ecocardiográficas não são suficientes para detectar as anormalidades, pois no momento que o paciente é examinado essas anormalidades podem não estar presentes. Isto dificulta a administração de um tratamento adequado com terapias anticoagulantes. Neste contexto fica clara a necessidade de biomarcadores capazes de identificar este subtipo de AVCI a tempo de prevenir uma recorrência (Montaner et al., 2008).

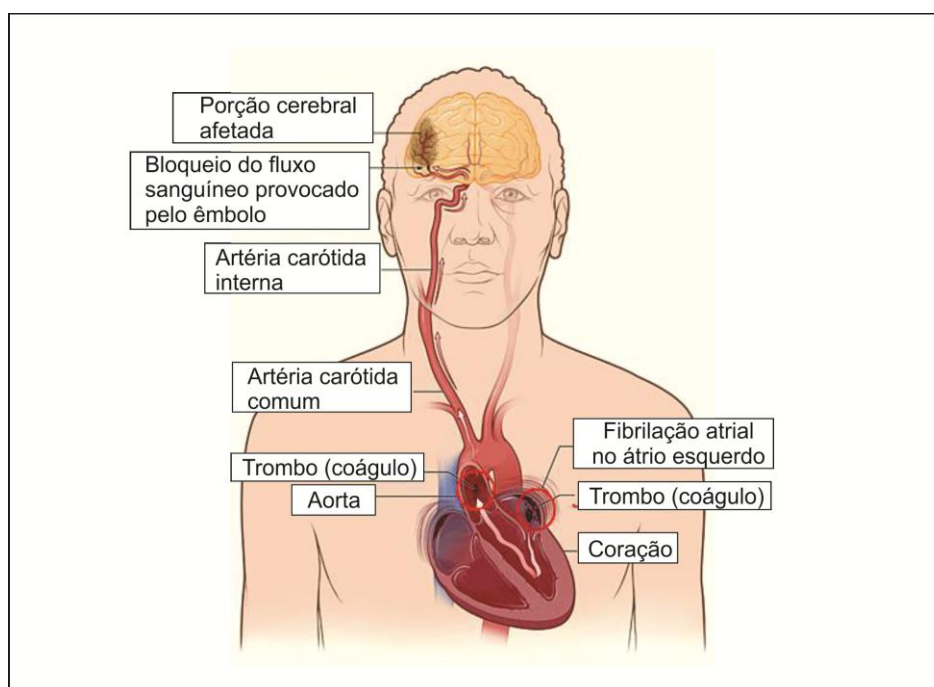


Figura 5. AVCI causado por fibrilação atrial (cardioembolia). A fibrilação atrial é um distúrbio grave do ritmo cardíaco. Essa grave arritmia faz com que as duas câmaras superiores do coração (os átrios) tremam ao invés de contrair-se de forma eficaz, o que resulta no mau bombeamento do sangue para fora do átrio. Nesta região, o sangue tende a coagular formando trombos/coágulos. Esses coágulos podem chegar ao cérebro, bloquear uma artéria e interromper o suprimento sanguíneo cerebral, causando o AVCI. Fonte: Adaptado de Ruff (2012).

1.3.3 Lacunar

Estima-se que um quarto dos casos de AVCI sejam causados por um infarto do subtipo lacunar (Sudlow et al., 1997, Jackson and Sudlow, 2005). Presume-se que os infartos lacunares no interior do cérebro são causados pela oclusão de uma única artéria perfurante

(Fig.6). Geralmente são pequenos enfartes com cerca de 2-20mm de diâmetro e ocorrem na substância branca cerebral profunda, gânglios basais ou ponte cerebral (Wardlaw, 2005). A oclusão arterial no AVCI lacunar pode ser resultante de arteriopatias trombóticas, tais como microateromas, lipohialinose e necrose fibrinóide; oclusão embólica de origem cardíaca ou aterosomatosa; e outros mecanismos, tais como desordens hemodinâmicas e alterações do endotélio arterial (Arboix and Martí-Vilalta, 2009).

Os progressos na compreensão da patologia arterial do AVCI lacunar têm sido limitados, grande parte do conhecimento advém de estudos em animais. Em humanos, estudos patológicos são raros, normalmente são realizados em tecidos oriundos de autópsia. Estes tecidos podem apresentar alterações anatômicas ocorridas durante a fase aguda do AVCI e/ou deformações causadas pelo processo de fixação (Herve et al., 2005, Gunda et al., 2009). No caso do subtipo lacunar, em que as taxas de mortalidade são relativamente baixas, esses estudos são ainda mais escassos (Jackson and Sudlow, 2005). A detecção do AVCI lacunar através de técnicas de imagem depende de técnicas mais avançadas e onerosas. A eficiência da tomografia computadorizada (TC) tem sido questionada para a detecção de lesões pequenas e em áreas profundas do cérebro, não apresentando sensibilidade satisfatória para detectar muitos casos. Já o uso da técnica de imagem de difusão por ressonância magnética tem demonstrado alta eficiência (Lynch et al., 2004, Wessels et al., 2005).

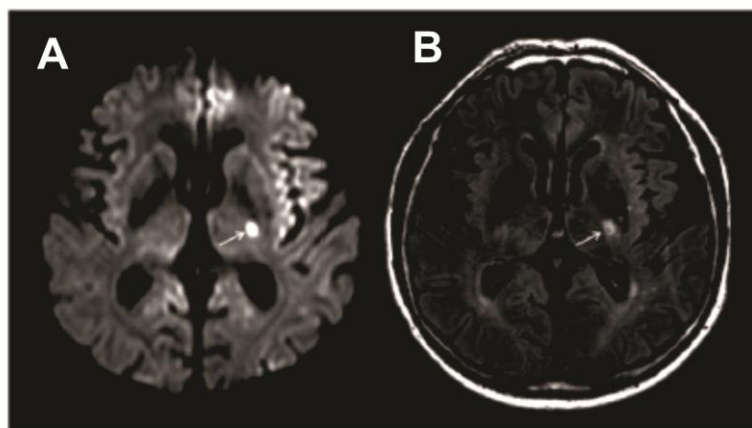


Figura 6. AVCI lacunar. Imagens do cérebro de um paciente hipertenso, com AVCI lacunar, obtidas através de imagem por ressonância magnética. Identificação de uma única lacuna no membro posterior da cápsula interna esquerda (setas brancas), causada por embolia. A = Ressonância magnética ponderada em difusão (em inglês: *Diffusion-weighted imaging*, sigla DWI) e B= Ressonância magnética usando fluido-atenuadas sequências de recuperação de inversão (em inglês: *Fluid-attenuated inversion recovery*, sigla: FLAIR). Fonte: Gunda et al. (2009).

Hipertensão e diabetes mellitus são os principais fatores de risco para o AVCI lacunar (Chen et al., 2009). Enfartes lacunares mostram uma evolução clínica paradoxal, com um prognóstico favorável a curto prazo, caracterizada por uma baixa mortalidade precoce, mas com um risco aumentado de morte, recorrência de AVC e demência em médio e longo prazo (Lund, 2014). A progressão assintomática da doença de pequenos vasos é uma característica típica dos infartos lacunares. Por esta razão, o infarto lacunar deve ser considerado como uma condição potencialmente grave, em vez de uma doença relativamente benigna e, portanto, pacientes com AVCI lacunar requerem manejo adequado e rigoroso acompanhamento (Arboix and Martí-Vilalta, 2009). O tratamento com antiplaquetários, o controle da pressão arterial, o uso de estatinas e a modificação do estilo de vida a fim de diminuir os fatores de risco são elementos fundamentais na prevenção secundária após o AVCI lacunar (Arboix and Martí-Vilalta, 2009, Del Bene et al., 2012).

1.3.4 Indeterminado ou criptogênico

De todos os casos de AVCI, 20-40% são classificados como indeterminado ou criptogênico (Sacco et al., 1989, Saposnik, 2012). Este subtipo de AVCI é definido como isquemia cerebral de origem obscura ou desconhecida, permanecendo indeterminada. Embora o termo "criptogênico" seja atribuído como classificação da doença, não existe doença onde não haja uma etiologia. A etiologia deste subtipo de AVCI permanece desconhecida por três motivos: (1) o caso pode ser transitório ou reversível e o diagnóstico propedêutico não ser realizado em tempo hábil, (2) as investigações podem não abordar todas as causas conhecidas de acidente vascular cerebral e (3) existem algumas causas de acidente vascular cerebral verdadeiramente desconhecidas. Deste modo, a taxa de AVCI criptogênico depende, portanto, de quão completo e rápido for a propedêutica (Altieri et al., 2009, Finsterer, 2010). Esta categoria também inclui pacientes com duas ou mais causas potenciais de acidente vascular cerebral, de modo que o médico é incapaz de determinar um diagnóstico final (Adams et al., 1993, Altieri et al., 2009). O risco de recorrência de AVCI e morte desses pacientes é alta. A falta de uma avaliação completa e a determinação do subtipo de AVCI pode levar ao tratamento inadequado do paciente e ao agravamento do seu quadro clínico (Nam et al., 2012). Para melhorar a compreensão dos mecanismos de AVCI, principalmente do subtipo indeterminado, as novas técnicas de investigação necessitam ser amplamente aplicadas e testadas. Elas incluem a tomografia computadorizada (CT), ressonância magnética (IRM), tomografia por

emissão de pósitrons (TEP) de placa da carótida e do arco aórtico, Doppler transcraniano, gravação cardíaca por telemetria, e até mesmo novos ensaios biológicos (Timsit and Breuille, 2009).

1.3.5 Outras etiologias determinadas

Esta categoria inclui pacientes com causas raras de acidente vascular cerebral, tais como vasculopatias não ateroscleróticas, estados de hipercoagulabilidade ou distúrbios hematológicos. Os pacientes deste grupo possuem resultados clínicos e de imagem que demonstram o AVCI e outros exames laboratoriais, como por exemplo, de sangue e arteriografia que revelam alguma dessas causas incomuns de AVCI (Adams et al., 1993). O quadro clínico, etiologia e evolução neurológica de AVCI de causa incomum têm sido raramente relatado na literatura. Em um estudo amplo realizado por Arboix et al. (2001), foram avaliados 2000 pacientes diagnosticados com AVCI, internados no Hospital Sagrat Cor de Barcelona entre 1986 a 1995. Destes pacientes, 70 foram diagnosticados com AVCI de etiologia incomum (32 homens e 38 mulheres). Este subtipo de AVCI foi responsável por 6% de todos os primeiros infartos cerebrais. As etiologias incluíram distúrbios hematológicos em 17 casos, infecção em 11, enxaqueca em 10, infarto cerebral secundário a trombose venosa em nove e condições vasculares inflamatórias primárias em seis e causas diversas em 17. Com este estudo, o autor concluiu que o AVCI de causa incomum é pouco frequente e com etiologias numerosas, embora tenha maior prevalência os distúrbios hematológicos. Ele destaca a necessidade de um melhor prognóstico para distinguir este subtipo dos demais subtipos de AVCI para uma melhor conduta no tratamento.

1.4 Fatores de Risco

Segundo Palomeras Soler and Casado Ruiz (2010) os fatores de risco para a doença podem ser agrupados em três categorias: fatores modificáveis, não modificáveis e outros. Os fatores de risco modificáveis são hipertensão, diabetes, fumo, fibrilação atrial, outras doenças cardíacas, hiperlipidemias, sedentarismo, estenose carotídea assintomática e ataques isquêmicos transitórios. Dentre os fatores de riscos não modificáveis estão idade, sexo, raça, etnia e hereditariedade. Outros fatores de risco são alcoolismo, anticorpo antifosfolípídeo, homocisteína elevada, processo inflamatório e infecção (Ohira et al., 2006, Fahimfar et al., 2012). Modelos animais sugerem que a susceptibilidade ao acidente vascular cerebral

isquêmico é influenciada por fatores genéticos e em humanos vários traços mendelianos decorrentes do defeito de um único gene foram descritos como uma característica proeminente no AVCI (Hassan and Markus, 2000, Dichgans, 2007). Vários estudos epidemiológicos em famílias e gêmeos revelaram que há um componente genético para o risco da doença. O AVCI pode ser o resultado de distúrbios de um único gene ou, mais comumente, uma doença poligênica multifatorial. Já foram encontradas mutações em vários genes candidatos estando associadas com AVCI (Munshi and Kaul, 2010).

1.5 Sinais, diagnóstico e tratamento

Segundo a Sociedade Brasileira de Doenças Cerebrovasculares (SBDC), os protocolos de conduta médica a serem seguidos pelos serviços médicos de emergência têm como bases as diretrizes da ASA (do inglês: *American Stroke Association*), EUSI (do inglês: *European Stroke Initiative*) e da Academia Brasileira de Neurologia (Oliveira-Filho et al., 2012, Jauch et al., 2013). Essas instituições também trabalham no desenvolvimento de várias campanhas com o intuito de promover o aprendizado e a conscientização da população sobre os sinais e fatores de risco para o AVCI (Obembe et al., 2014).

Nos casos de AVCI têm sido demonstrado que o grau de lesão neuronal é claramente uma função da duração da isquemia *versus* a extensão da lesão. Estima-se que o tempo de aproximadamente 3-4,5 horas represente a janela de oportunidade disponível para o tratamento com trombolíticos, restabelecendo o fluxo sanguíneo, e conseqüentemente diminuindo os danos neurológicos (del Zoppo et al., 2009). Isso destaca a necessidade de rapidez e eficiência na detecção dos sinais, no acionamento dos serviços de emergência médica e de transporte e a rápida avaliação e tratamento no departamento de emergência. Estes elementos são essenciais para o sucesso do tratamento de AVCI e diminuição das sequelas (Thurman and Jauch, 2002, Adams et al., 2007).

Os principais sinais iniciais apresentados por um indivíduo que está tendo uma crise de AVCI, também conhecidos como sinais de alerta são: assimetria facial (sorriso torto); dormência ou fraqueza repentina, geralmente em apenas um lado do corpo (incapacidade de levantar um dos braços ou pernas); confusão súbita; dificuldade na fala ou compreensão; dificuldade de enxergar em um ou ambos os olhos; súbita dificuldade de caminhar; dificuldade de engolir; dor de cabeça súbita e grave, sem causa conhecida; perda de

concentração e memória; perda do controle de urinar ou defecar (incontinência); e vertigem súbita intensa, perda de equilíbrio ou coordenação (Quah et al., 2014). O pronto reconhecimento destes sinais pela população pode acelerar o processo de encaminhamento do paciente ao serviço de emergência (Jauch et al., 2013)

A avaliação inicial de um paciente com sinais de AVCI pelo serviço médico é semelhante ao de outros doentes críticos: é prioritária a manutenção das vias aéreas e a estabilização da respiração e circulação. Este processo é rapidamente seguido por uma avaliação secundária de déficit neurológico (Adams et al., 2007). Neste ponto é importante realizar o diagnóstico diferencial e excluir condições patológicas que apresentam sintomas semelhantes ao AVCI, tais como: transtorno conversivo, que tem como características a presença de sintomas ou déficits que afetam a função motora ou sensorial voluntária; encefalopatia hipertensiva que têm como principais sintomas a dor de cabeça, delírio, hipertensão significativa e edema cerebral; diabetes e glicemia alta ou baixa que podem levar a perda de consciência; enxaqueca; convulsões; intoxicações exógenas; distúrbios metabólicos; doenças desmielinizantes; dentre outras (Davis et al., 2006, Jauch et al., 2013).

O rebaixamento do nível de consciência, associado a um déficit neurológico focal, pode estar presente em alguns pacientes com hipoglicemia. A redução isolada do nível de consciência raramente está associada ao AVCI. Na presença de um tumor cerebral, o exame neurológico pode, em alguns casos, não esclarecer o diagnóstico, que muitas vezes só poderá ser definido, após a realização de uma história clínica detalhada, associada com a informação obtida pelos exames complementares, como a tomografia computadorizada de crânio ou ressonância magnética do encéfalo. As crises epiléticas ou convulsões, principalmente quando associadas a um déficit neurológico, podem oferecer alguma dúvida inicial no diagnóstico. O AVC isquêmico associado à embolia de origem cardíaca pode ser identificado não somente pelo modo de apresentação, que na maioria das vezes é súbito, mas também pela presença de fatores de risco associados como fibrilação atrial ou infarto do miocárdio recente ou a miocardiopatia dilatada. Por outro lado, o AVC isquêmico relacionado à doença de pequenas artérias ou lacunas apresentam síndromes clínicas típicas destas localizações como síndrome motora pura, sensitiva pura, ou hemiparesia-ataxia etc. (Davis et al., 2006, Stankowski and Gupta, 2011, Patti et al., 2012)

Atualmente, o diagnóstico do AVC prevalece com base em fundamentos clínicos e na avaliação de neuroimagem (Yew and Cheng, 2009). Na maioria das instituições, a tomografia computadorizada (TC) do cérebro é realizada como parte da avaliação inicial de um paciente com suspeita de acidente vascular cerebral. A principal vantagem desta modalidade de imagem é a sua generalizada disponibilidade e sensibilidade para o AVC hemorrágico. No entanto, é insensível ao início de alterações isquêmicas durante a isquemia cerebral aguda, sendo geralmente de pouco valor para estabelecer o diagnóstico de AVCI agudo, lesões com pequenas dimensões ou em algumas regiões do cérebro, tais como tronco cerebral e áreas do cerebelo (Lynch et al., 2004, Yew and Cheng, 2009). Para o AVCI, as técnicas de imagem por ressonância magnética (IRM) se destacam devido à alta sensibilidade para o diagnóstico precoce (Jiang et al., 2011). O uso de técnicas multimodais de IRM podem identificar o tempo e os territórios vasculares envolvidos em enfartes, além de permitir precocemente a identificação rápida dos subtipos isquêmicos (Bang, 2009, Arsava, 2012). No entanto, a maioria dos hospitais não possuem esses serviços especializados de IRM disponíveis (Jiang et al., 2011, Yoo et al., 2011).

O AVCI por ser uma doença etiologicamente heterogênea, a identificação da causa específica em cada paciente tem importantes implicações clínicas. O prognóstico, a administração de estratégias iniciais e de longo prazo para prevenir recidivas pode variar consideravelmente para os diferentes subtipos de AVCI (Montaner et al., 2008). O principal método para reduzir o dano neurológico em pacientes que com AVCI é o rápido restabelecimento do fluxo sanguíneo e da oxigenação no tecido isquêmico, através da reperfusão (Nour et al., 2012). No entanto, paradoxalmente, a restauração do fluxo de sangue e oxigênio, no primeiro momento, pode provocar um aumento da área lesionada. Esse processo é chamado de lesão de isquemia-reperfusão e é caracterizado pelo aumento da geração de EROs pelas células do parênquima, do endotélio e por leucócitos infiltrantes. As mitocôndrias desempenham um papel crítico na lesão de isquemia-reperfusão. As grandes concentrações de EROs e cálcio podem promover a transição da permeabilidade da membrana interna mitocondrial, impossibilitando a produção de ATP e o declínio energético, consequentemente, leva à morte celular (Sims and Muyderman, 2010). Além disso, outros mecanismos desencadeados pelo excesso de produção de EROs também culminam no aumento da lesão, sendo eles: peroxidação dos ácidos graxos das membranas celulares; oxidação de grupos sulfidríla inativando uma variedade de enzimas; alterações do DNA

inibindo a síntese de ATP e consumindo as reservas de dinucleotídeos adenínicos; direta inativação do óxido nítrico comprometendo os relaxamentos vasculares do endotélio; formação de peroxinitrito, um ânion instável e tóxico, resultante da reação do óxido nítrico com o oxigênio; ativação de citocinas; ruptura da barreira hematoencefálica e estimulação da agregação plaquetária nos vasos sanguíneos reperfundidos (Bolanos and Almeida, 1999, White et al., 2000, Nour et al., 2012, Sanderson et al., 2013).

O único agente farmacológico aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para uso em AVCI agudo é o trombolítico ativador do plasminogênio (t-PA), que, se administrado por via intravenosa nas primeiras 3-4,5 horas do AVCI, reduz o déficit neuronal e melhora o resultado funcional dos pacientes (Hacke et al., 2004). O t-PA é uma serina protease que atua na conversão do plasminogênio em plasmina. A plasmina é a enzima responsável pelo processo de fibrinólise (degradação da fibrina presente nos coágulos/trombos), promovendo a degradação dos coágulos que bloqueiam o fluxo sanguíneo permitindo a reperfusão (Nagai et al., 2004). Apesar de apresentar efeitos benéficos, alguns estudos apontam os efeitos colaterais do uso do t-PA, dentre eles, podemos citar o aumento da ruptura da barreira hematoencefálica através da ativação de metaloproteinases da matriz; efeitos pró-hemorragicos; e ativação dos canais de ácido glutâmico resultando no aumento do influxo de cálcio intracelular (Cheng et al., 2006, Hermann and Matter, 2007, Jin et al., 2010b, Stankowski and Gupta, 2011).

Grande parte dos pacientes que sobrevivem ao AVCI apresentam incapacidade funcional e muitos dependem de tratamento por toda a vida. Dependendo do tipo de lesão, do tamanho e da área lesionada, os sobreviventes podem apresentar sequelas graves, tais como, neurodisfunção muscular; perda de habilidades cognitivas e de memória; perda de visão; paralisia dos membros; perda da fala; depressão; dentre outros (Haacke et al., 2006, Feigin et al., 2008).

1.6 Biomarcadores de AVCI

As limitações dos métodos de diagnóstico existentes atualmente para o AVCI, principalmente para a forma aguda, torna necessário o desenvolvimento de novos dispositivos que sejam práticos, rápidos e de baixo custo. Muitos estudos têm avaliado o potencial de biomarcadores para o diagnóstico e determinação da etiologia do AVCI (Garcia-Berrocso et

al., 2010, Kim et al., 2010). A pesquisa atual é voltada principalmente para biomarcadores presentes no sangue, por ser uma forma de diagnóstico acessível e pouco invasiva (Garcia-Berrocso et al., 2010). No AVCI, muitos estudos têm se concentrado em proteínas individuais e painéis moleculares selecionados por estarem relacionadas com a fisiopatologia da doença, como por exemplo, marcadores de danos teciduais cerebrais, inflamação, endotélio, coagulação e trombose (Maas and Furie, 2009, Jickling and Sharp, 2011). Mais de 58 proteínas individuais e sete painéis de proteínas associadas têm sido descritas como potenciais biomarcadores de AVCI (Maas and Furie, 2009, Stamova et al., 2010).

Um estudo realizado por Lynch et al. (2004) examinou a viabilidade de um teste diagnóstico baseado em um painel de 26 biomarcadores sanguíneos relacionados com AVCI, através de ensaios de ELISA. Como principal resultado, foi encontrado que apenas quatro dos 26 biomarcadores foram altamente correlacionados com AVCI agudo: um marcador de ativação glial (S100B), dois marcadores de inflamação (MMP-9: matriz metaloproteinase-9) e molécula de adesão celular vascular (VCAM) e um marcador de trombose (vWF: Fator de Von Willebrand). Esses biomarcadores apresentaram 90% de sensibilidade e especificidade para a predição de AVCI. Jauch et al. (2006) avaliaram a presença de um painel de biomarcadores associados à lesão neuronal, glial e endotelial no soro de 359 indivíduos. O painel de biomarcadores era composto por proteína básica de mielina, enolase específica neuronal, S100B e trombomodulina solúvel. Embora os resultados tenham demonstrado uma correlação desses biomarcadores (exceto trombomodulina) com características clínicas e radiográficas do AVCI agudo, não ficou bem definido qual seria o papel desses biomarcadores na gestão e prognóstico do AVCI.

Alguns estudos têm avaliado o potencial de um painel de biomarcadores disponível comercialmente ("Triage[®] Stroke Panel", Biosite, Inc., San Diego, CA) para o diagnóstico de AVCI, composto por D-dímero, MMP-9, peptídeo natriurético cerebral e SM100B. Kim et al. (2010) testaram este painel em um grupo de amostras de 197 indivíduos e verificaram que a capacidade discriminatória entre pacientes com AVCI agudo e indivíduos do grupo controle foi modesta. Verificaram ainda que, nenhum dos biomarcadores individualmente foi capaz de diagnosticar o AVCI e que o uso do painel de biomarcadores não foi eficiente para discriminar entre AVCI e AVC hemorrágico. Outro estudo, usando o mesmo painel de biomarcadores foi conduzido por Knauer et al. (2012) cujo método foi baseado em imagem por ressonância magnética. Eles analisaram a presença desses biomarcadores no plasma de

174 pacientes e encontraram que nenhum marcador isoladamente ou a combinação dos quatro biomarcadores beneficiaram significativamente o diagnóstico de AVCI agudo.

Biomarcadores podem ser classificados pela sua aplicação clínica prevista. A busca de biomarcadores para o AVCI crônico também é de fundamental importância. No AVCI, vários estudos têm investigado biomarcadores para distinguir AVCI de outras patologias que mimetizam a doença, para determinar a etiologia, para prever a gravidade e os resultados, incluindo deterioração e complicações hemorrágicas neurológicas precoces, e identificar os pacientes que podem se beneficiar de terapias específicas, incluindo hemicraniectomia descompressiva e recanalização arterial (Jickling and Sharp, 2011). Alguns biomarcadores têm demonstrado sucesso na previsão de AVCI recorrente, por exemplo, pacientes que possuem a lipoproteína fosfolipase A2 aumentada no sangue, após terem tido o primeiro AVCI, possuem maior risco de ter um AVCI recorrente (Elkind et al., 2009). A investigação de biomarcadores de AVCI na fase crônica pode ser extremamente útil para complementar o diagnóstico e favorecer a tomada de decisão clínica no que se refere ao tratamento da doença (Milot and Cramer, 2008).

Ao contrário de outras doenças neurodegenerativas, existem poucos estudos relacionados com a busca de biomarcadores não proteicos para AVCI (Jiang et al., 2011). Para doenças como Alzheimer, por exemplo, vários estudos têm demonstrado um importante papel de metabólitos como aminoácidos e ácidos graxos como potenciais biomarcadores para a doença (Ravaglia et al., 2004, Wang et al., 2012).

2. METABOLÔMICA

Embora desde meados de 1960 já houvessem trabalhos publicados demonstrando a separação e identificação de metabólitos em amostras biológicas, somente após o ano 2000, com o melhoramento das antigas técnicas de análise de química analítica e o surgimento de novas técnicas é que os conceitos em metabolômica foram estabelecidos e difundidos (Fiehn, 2001, Zhang et al., 2011). Nicholson e colaboradores foram um dos primeiros a desenvolver estudos metabolômicos e os responsáveis pela criação dos termos "metabonômica" e "metabolômica", de modo que o termo metabonômica foi aplicado para designar a resposta metabólica dinâmica dos sistemas vivos a estímulos biológicos externos, tais como estresse, doenças, fármacos, dentre outros; enquanto o termo "metabolômica" foi criado para designar

a descrição analítica de amostras biológicas complexas (Nicholson et al., 1999). Atualmente, os dois termos são usados indistintamente e ganharam adaptações, além disso, outros termos/conceitos têm sido amplamente empregados. Dentre eles, podemos citar o termo "metaboloma" que se refere ao conjunto de metabólitos produzidos por uma célula através do seu metabolismo. A "metabolômica" é considerada a ciência responsável pela caracterização de fenótipos metabólicos (o metaboloma) em determinadas condições (tais como, diferentes estágios de desenvolvimento, doenças, diferentes condições ambientais, dentre outros), deste modo, passando a substituir o termo "metabonômica"(Fiehn, 2001, Villas-Boas et al., 2005). Outro conceito se refere aos metabólitos que são considerados pequenas moléculas de baixa massa molecular (<1000Da) produzidas através das múltiplas vias biossintéticas e catabólicas existentes em humanos e outros sistemas vivos (Pasikanti et al., 2008).

O metaboloma, definido como a reflexão da dinâmica metabólica derivada de parâmetros medidos principalmente nos fluidos biológicos, células e tecidos, pode ser considerado como o conjunto de dados que está mais próximo do fenótipo, uma vez que integra as influências genéticas e não genéticas (Homuth et al., 2012). O metaboloma compreende desde espécies iônicas a carboidratos hidrofílicos, álcoois e cetonas voláteis, aminoácidos e ácidos orgânicos, lipídios hidrofóbicos e produtos naturais complexos. Essa complexidade química, adicionada à enorme variação de concentrações (variando de *p*moles a *m*moles), torna a análise simultânea de todo o metaboloma de uma célula uma tarefa praticamente impossível (Villas-Boas et al., 2005). Para obter a maior quantidade de informações possível têm sido aplicados novos métodos de preparo de amostras e análises usando diferentes técnicas analíticas associadas ao tratamento dos dados através de bioestatística (análises multivariadas e padrões de reconhecimento) (Worley and Powers, 2013).

Do ponto de vista analítico, atualmente existem duas abordagens principais para a análise do metaboloma: (a) análise direcionada e (b) perfil metabólico, sendo que este último pode ainda ser subdividido em (i) *fingerprinting* metabólico, quando se refere ao perfil de metabólitos intracelulares e (ii) *footprinting* metabólico, quando se refere ao perfil de metabólitos extracelulares (Villas-Boas et al., 2005). Um perfil metabólico pode ser definido empiricamente como o conjunto de todos os metabólitos ou produtos derivados detectados pela análise de uma amostra usando uma técnica analítica particular, acompanhado pela quantificação (Fiehn, 2002, Villas-Boas et al., 2005). A análise de perfis metabólicos permite

identificar alvos metabólicos, tais como, um painel de aminoácidos, ácidos graxos, carboidratos, esteróis, dentre outros (Fiehn, 2001).

Na pesquisa atual diversas estratégias analíticas diferentes são aplicadas para a análise de uma grande variedade de metabólitos. Dependendo da questão biológica, diferentes abordagens analíticas são necessárias e diferentes demandas de desempenho analíticos são requeridos, por exemplo, limites de detecção, precisão, exatidão, etc. (Koek et al., 2011). Estudos de perfis metabólicos têm usado uma gama de plataformas analíticas, tais como cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (do inglês: *Gas chromatography-mass spectrometry*, sigla: GC-MS), cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (do inglês: *Liquid chromatography-mass spectrometry*, sigla: LC-MS), eletroforese capilar acoplada a espectrometria de massas, espectroscopia de ressonância magnética nuclear (do inglês: *Nuclear magnetic resonance spectroscopy*, sigla: NRM), espectroscopia por infravermelho ou de Raman, detectores eletroquímicos ou espectrometria de massas por injeção direta, dentre outras (Pasikanti et al., 2008, Dunn et al., 2011, Jung et al., 2011). A escolha da técnica analítica também está relacionada com as propriedades físicas e químicas dos metabólitos a serem analisados, por exemplo, tamanho, volatilidade, presença de grupos ionizáveis, compostos ácidos ou básicos, e etc. (Dunn et al., 2011). Deste modo, projetos que visam a identificação de várias classes metabólicas, como o estudo desenvolvido por Psychogios et al. (2011) que tinha como objetivo a caracterização do metaboloma do soro humano, sendo o soro humano uma matriz complexa, geralmente múltiplas técnicas são empregadas. Neste estudo, foram usadas as técnicas de GC-MS, LC-MS e NRM para a identificação e quantificação de 4 229 metabólitos presentes no soro de indivíduos saudáveis. Este trabalho fazia parte do projeto metaboloma humano e os metabólitos encontrados foram registrados no banco de dados "The serum metabolome database" (<http://www.serummetabolome.ca/>).

Para responder a questões biológicas através de metabolômica é fundamental ter uma clara definição dos passos a serem seguidos para alcançar tais objetivos. Primeiramente deve ser estudado e criado um desenho experimental adequado onde devem ser levados em consideração o tipo amostral, o que se pretende analisar nas amostras, o melhor método de preparo das amostras para cada tipo de técnica analítica, o estabelecimento adequado dos parâmetros operacionais de acordo com o equipamento a ser utilizado e a melhor forma de aquisição e processamento dos dados. Qualquer método experimental analítico depende de

otimização/validação para que sua qualidade e confiabilidade possam ser reconhecidas (Wu et al., 2009, Koek et al., 2011). Os passos básicos do delineamento experimental de um estudo metabolômico é demonstrado na **figura 7**.

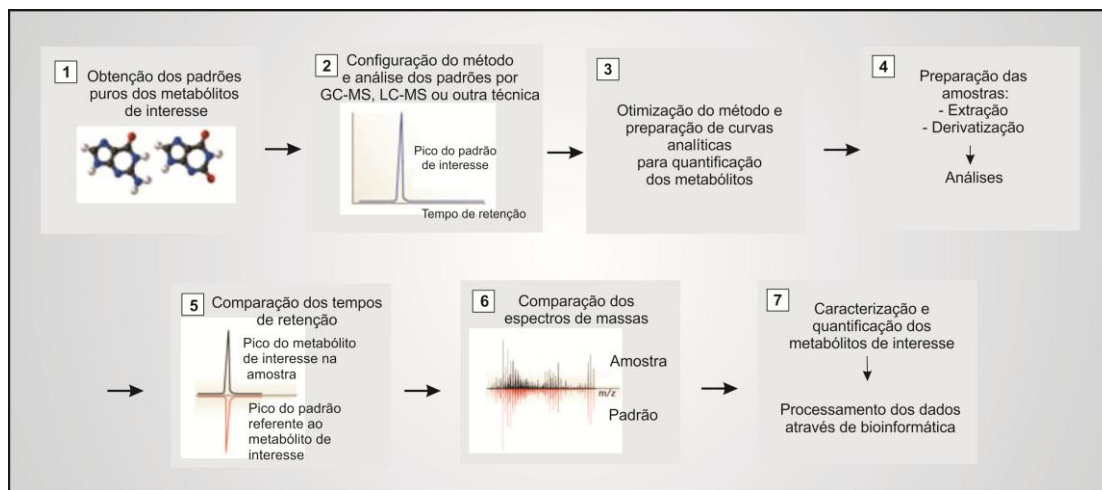


Figura 7. Esquema do fluxo de trabalho em metabolômica. Fonte: Adaptado de Patti et al. (2012) e Koek et al. (2011).

A maioria dos estudos metabolômicos resulta em conjuntos complexos de dados multivariados com diferentes correlações entre os níveis de metabólitos, de modo que as análises estatísticas multivariadas são essenciais para explorar esses dados (Szymanska et al., 2012). Dentre as técnicas de análises mais comumente empregadas estão a análise de componentes principais (PCA), análises de agrupamento, método dos mínimos quadrados parcial discriminante (PLS-DA), e suas variações (Ramadan et al., 2006, Jiang et al., 2011, Gao et al., 2013). Outra ferramenta que têm-se destacado para a classificação de dados em metabolômica é o método de máquinas de suporte de vetores discriminante (SVM-DA). Segundo Mahadevan et al. (2008), o método SVM-DA é superior ao PLS-DA em estudos metabolômicos, pelo seu maior poder preditivo e de exatidão com um menor número de características selecionadas, isto é, quando se aplica a seleção de variáveis mais representativas da amostra. Os estudos metabolômicos têm contribuído para a compreensão dos mecanismos, para o diagnóstico e tratamento de várias doenças. A determinação dos metabólitos contidos em amostras de sangue fornece uma visão ampla sobre muitos mecanismos de doenças humanas e possibilita a identificação de biomarcadores. Esclerose múltipla, fibrose cística, aterosclerose, hepatite aguda, anemia e câncer são algumas das várias doenças em que o monitoramento de metabólitos no sangue é aplicado com a finalidade de triagem e diagnóstico (Dwivedi et al., 2010). Merecem destaque também as descobertas iniciais obtidas, através de estudos metabolômicos, nos distúrbios do sistema nervoso central,

como a esquizofrenia, transtorno depressivo, transtorno bipolar, esclerose lateral amiotrófica e doença de Parkinson (Quinones and Kaddurah-Daouk, 2009).

Dado que o estado geral de saúde de um indivíduo é representado pelo seu estado metabólico, que é um reflexo do que foi codificado pelo genoma e modificado por fatores ambientais, a metabolômica tem o potencial para ter um grande impacto sobre a prática médica, proporcionando uma grande riqueza de dados bioquímicos (Quinones and Kaddurah-Daouk, 2009). Jiang et al. (2011), realizaram um estudo do metaboloma, utilizando cromatografia líquida de alta performance acoplada ao espectrômetro de massas com analisador do tipo tempo de voo (do inglês: *ultra-performance liquid chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry*, UPLC-TOF-MS) no soro de pacientes com AVCI e constataram que alguns metabólitos presentes no ciclo do carbono (ácido fólico, cisteína, homocisteína e glutatona) possuem potencial para se tornarem biomarcadores da doença. Embora novos estudos sejam necessários, esses resultados sugerem que a abordagem metabolômica é altamente eficaz em auxiliar na identificação do AVCI, implicando em uma nova estratégia para o diagnóstico precoce da doença.

2.1 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS)

Um dos principais objetivos dos estudos metabolômicos é a identificação de mudanças sutis nos perfis metabólicos entre os sistemas biológicos nos estados fisiológicos e patológicos. A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) tem sido uma ferramenta analítica amplamente utilizada para a análise de perfis metabólicos em vários fluidos biológicos, tais como urina, plasma, fluido cérebro espinhal e saliva (De Paoli and Bell, 2008, Chan et al., 2011, de Paiva et al., 2013). É uma técnica com alta sensibilidade, alta resolução e reprodutibilidade, sendo apropriada para a detecção/quantificação de metabólitos com a massa molecular de até 1000Da (Pasikanti et al., 2008).

A cromatografia gasosa é uma técnica de separação de substâncias volatilizáveis, cuja separação baseia-se na diferente distribuição das substâncias da amostra entre uma fase estacionária, que recobre a parte interna da coluna capilar, e uma fase móvel gasosa, conhecida como gás de arraste (James and Martin, 1952). Existem colunas com várias espessuras, tamanhos e fases estacionárias compostas por diferentes substâncias químicas. O gás de arraste mais amplamente utilizado é o gás hélio ultrapuro, mas em determinadas

análises podem ser usados outros gases como nitrogênio, hidrogênio e argônio. A interação dos metabólitos da amostra com a fase estacionária e a fase móvel é influenciada por forças intermoleculares, tais como, iônicas, dipolares, apolares e específicos efeitos de afinidade e solubilidade (Collins et al., 2006).

A espectrometria de massas é uma técnica usada para o estudo das massas dos átomos, moléculas ou fragmentos de moléculas. Para obter um espectro de massas, moléculas no estado gasoso precisam ser ionizadas. Os íons formados são acelerados por um campo elétrico e separados de acordo com a razão entre suas massas e suas cargas elétricas, m/z . Conhecendo o valor de m/z de uma molécula é possível inferir sua composição química elementar, e com isso, determinar sua estrutura. (Budzikiewicz, 2005).

Quando duas técnicas diferentes, como a cromatografia gasosa (GC) e a espectrometria de massas (MS) são acopladas para formar GC-MS, as vantagens tornam-se evidentes. A GC pode separar muitos compostos voláteis e semi-voláteis, mas nem sempre pode detectá-los seletivamente, enquanto que MS pode detectar seletivamente muitos compostos, mas nem sempre separá-los (Sneddon et al., 2007). Várias características tornam vantajoso o uso de GC-MS para análises metabolômicas: a alta sensibilidade permite o uso de pequenas quantidades de amostras para detecções precisas (normalmente é possível detectar 10^{-12} g de um determinado metabólito ou até menos); bancos de dados consistentes; ampla biblioteca de espectros de massas e muitos protocolos experimentais disponíveis (Kanani et al., 2008).

Apesar das vantagens, existe um inconveniente para a análise de amostras biológicas por GC-MS que é o pré-tratamento das amostras. Este pré-tratamento consiste basicamente em dois passos: a extração dos metabólitos de interesse e a derivatização destes metabólitos. Estes passos são cruciais para possibilitar as análises por GC-MS e os métodos para alcançá-los variam de acordo com a complexidade da amostra e o tipo de metabólito que se pretende identificar e quantificar. O plasma sanguíneo, por exemplo, é uma matriz complexa, rica em diversas classes de moléculas com diferentes concentrações e massas moleculares, sendo constituído em sua maior parte por proteínas. Em um estudo desenvolvido por A et al. (2005) foram testados vários métodos para a desproteinização do plasma usando diferentes solventes orgânicos, com o objetivo de obter o extrato da amostra contendo apenas os metabólitos de baixa massa molecular. Dentre os solventes orgânicos testados: metanol, etanol, acetonitrila,

acetona e clorofórmio, foi demonstrado que o metanol teve o melhor desempenho para a extração de metabólitos de baixa massa molecular em amostras de plasma em relação aos demais.

O segundo passo do pré-tratamento das amostras biológicas é a derivatização. A técnica de GC-MS é voltada para a análise de compostos voláteis e termicamente estáveis. Como a maioria dos metabólitos presentes nas amostras biológicas não possuem estas características, é necessário que eles sejam derivatizados antes que possam ser submetidos à GC-MS. O objetivo da derivatização é promover a redução da polaridade de grupos funcionais presentes nos metabólitos ou adicionar grupos específicos, de modo a facilitar a separação e aumentar a detectabilidade dos metabólitos a serem investigados (Dunn et al., 2011). Existem vários tipos de compostos químicos capazes de promover a derivatização. A seleção do melhor derivatizante é baseada na classe química dos metabólitos que se pretende identificar e quantificar (Kanani et al., 2008).

Para a análise por GC-MS, moléculas contendo grupos funcionais como -COOH, -OH, -NH e -SH, são de grande preocupação devido à sua capacidade de formarem pontes de hidrogênio entre os compostos. A presença destes grupos leva a uma fraca volatilidade, a uma estabilidade térmica insuficiente, ou pode provocar a interação inadequada dos compostos com a fase estacionária da coluna, resultando em baixa detectabilidade (Zaikin and Halket, 2005, Villas-Boas et al., 2011). Uma das reações mais utilizadas para diminuir a polaridade de uma amostra é a sililação. Nas reações de sililação, os hidrogênios pouco estáveis dos ácidos, álcoois, tióis, aminas, amidas ou cetonas enolizáveis e aldeídos, são substituídos por um grupo trimetilsilil (Halket and Zaikin, 2003). Para a derivatização de moléculas, como por exemplo, aminoácidos, a sililação têm se destacado como melhor método. Neste caso, a sililação permite a proteção dos grupos amino e carboxila dos aminoácidos, que em condições normais são pouco voláteis e facilmente convertidos em dicetopiperazinas sob altas temperaturas (aproximadamente 250°) (Gehrke et al., 1971, Zaikin and Halket, 2005).

Além de diferentes reagentes, uma gama de temperaturas e tempos de reação de derivatização são relatados na literatura, sendo que em alguns protocolos o tempo de reação pode durar até três horas (Dunn et al., 2008, Begley et al., 2009). Um estudo recente desenvolvido por de Paiva et al. (2013), apresentou um método alternativo e rápido de derivatização e análise de amostras de líquido cefalorraquidiano para a detecção de 16

aminoácidos por GC-MS. Neste estudo, a derivatização das amostras foram feitas utilizando *N, O-bis-(trimetilsilil)trifluoacetamida* (BSTFA) como agente de derivatização, seguida por irradiação em forno de micro-ondas com 210W de potência, durante apenas 3 minutos, em um único passo.

Em uma análise por GC-MS, basicamente, a amostra após ser preparada, é introduzida no cromatógrafo por meio de um sistema de injeção em uma coluna contendo a fase estacionária. O uso de temperaturas convenientes no local de injeção da amostra e na coluna possibilita a vaporização das substâncias da amostra que, de acordo com suas propriedades e as da fase estacionária, são retidas por tempos determinados na coluna e chegam dentro da câmara de ionização do espectrômetro de massas em tempos diferentes. Na câmara de ionização, a ionização é feita principalmente por impacto de elétrons ou ionização química. No método de impacto de elétrons, um fluxo de elétrons é produzido por um filamento de tungstênio ou rênio aquecido. Esses elétrons, com energia de aproximadamente 70 eV colidem com as moléculas da amostra, promovendo sua fragmentação e ionização. O padrão de fragmentação de cada molécula é característico, o que permite a identificação da estrutura do metabólito. Os íons formados deixam a câmara de ionização e entram no analisador de massas, onde são separados de acordo com a razão m/z , através da imposição de um campo elétrico ou magnético. Os íons percorrem este campo e colidem com o detector onde ocorre uma amplificação do sinal elétrico gerado, em seguida os sinais são processados através de softwares específicos, fornecendo dados quantitativos e qualitativos. As informações qualitativas são obtidas através da interpretação dos espectros de massas e a comparação dos fragmentos com as bibliotecas de espectros presentes nos softwares. Já os dados quantitativos podem ser obtidos pelo cálculo da área dos picos cromatográficos que caracterizam os metabólitos de interesse (Collins et al., 2006, Hübschmann, 2008, Pasikanti et al., 2008). O esquema básico de um cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas está representado na **figura 8**.

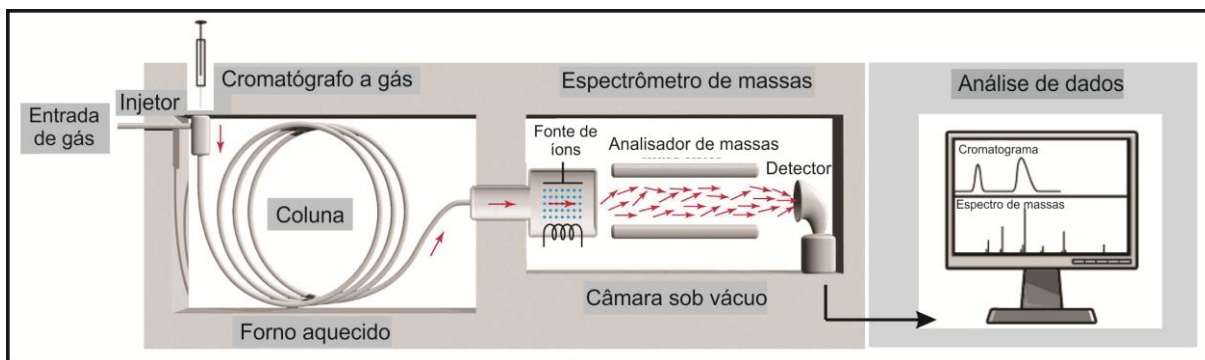


Figura 8. Esquema representando os componentes básicos de um cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas. Adaptado de Shalaby (2013).

A confiabilidade e adequação do preparo das amostras, o estabelecimento adequado dos parâmetros de análise nos equipamentos utilizados, a aquisição e o processamento correto dos dados obtidos são pré-requisitos fundamentais para os estudos em metabolômica (Koek et al., 2011). Todo método analítico, incluindo GC-MS, deve passar por um processo de padronização seguido pela avaliação da sua capacidade de gerar informações confiáveis e reproduzíveis. Este processo de avaliação recebe o nome de validação. No Brasil, há duas agências credenciadoras para verificar a competência de laboratórios de ensaios, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). Estes órgãos disponibilizam guias para os procedimentos de validação dos métodos analíticos. Um processo de validação bem definido e documentado oferece às agências reguladoras evidências objetivas de que os métodos e os sistemas são adequados para o uso desejado (Ribani et al., 2004).

3. AMINOÁCIDOS: metabolismo e funções no cérebro

Os aminoácidos são as unidades estruturais a partir das quais as proteínas são sintetizadas. Os D-aminoácidos são componentes dos polipetídeos presentes nas paredes celulares de bactérias, enquanto que as proteínas humanas são sintetizadas a partir dos L-aminoácidos. Estruturalmente, com exceção da prolina, um α -aminoácido é constituído por um grupamento carboxila, um grupamento amina, um átomo de hidrogênio e uma cadeia lateral (também conhecida como radical, grupo R ou grupo substituinte) característica para cada um dos vinte tipos de aminoácidos padrão existentes, ligados a um átomo de carbono (denominado carbono alfa) (**Figura 9**) (Cozzone, 2001). Os grupos R dos aminoácidos variam em estrutura, tamanho e carga elétrica, o que influencia na solubilidade dos aminoácidos em

água. Os aminoácidos são classificados em grupos de acordo com a semelhança no esqueleto de carbono, nos grupos substituintes ou por possuírem uma via metabólica em comum. Por exemplo, a metionina, cisteína e taurina são aminoácidos que contêm enxofre; tirosina, fenilalanina e triptofano são chamados de "aromáticos", porque eles têm uma cadeia lateral aromática; e valina, leucina e isoleucina são chamados de "aminoácidos de cadeia ramificada" porque possuem uma cadeia lateral alifática ramificada em comum (Deferrari et al., 2001).

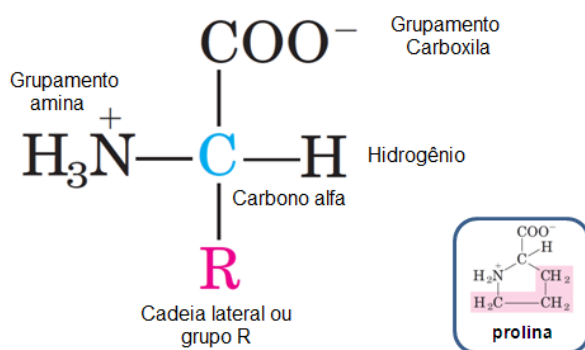


Figura 9. Estrutura geral de um aminoácido. Esta estrutura é comum a todos os α -aminoácidos, com exceção da prolina que é um aminoácido cíclico. O grupo R ou cadeia lateral é diferente em cada aminoácido, dando propriedades específicas a cada um deles. Adaptado de Nelson and Cox (2008).

Os aminoácidos também podem ser classificados nutricionalmente em essenciais, condicionalmente essenciais e não essenciais (**Quadro 1**). Embora as plantas e as bactérias sejam capazes de sintetizar todos os 20 aminoácidos, os animais não possuem tal capacidade pela ausência de muitas das enzimas necessárias. Logo, os aminoácidos classificados como essenciais são aqueles que o organismo humano não consegue sintetizar e precisa obtê-los através da dieta. Os aminoácidos condicionalmente essenciais são aqueles que normalmente são produzidos pelo organismo em quantidade adequada, mas que, sob determinadas condições (patologias, idade, gravidez, dentre outras), a síntese pode ser insuficiente sendo necessário obtê-los da dieta. Os aminoácidos são considerados não essenciais quando o organismo consegue sintetizá-los em quantidades ideais através do *turnover* proteico (degradação de proteínas para formar novas) (Deferrari et al., 2001, Wu, 2009).

A biossíntese de aminoácidos envolve várias vias metabólicas em que os aminoácidos são montados a partir de outros precursores. Os esqueletos de carbono de aminoácidos são derivados a partir de sete intermediários, os quais são encontrados em três vias metabólicas diferentes. Estes incluem (1) três intermediários da via glicolítica (3-fosfoglicerato,

fosfoenolpiruvato e piruvato); (2) dois intermediários da via de pentose fosfato (ribose 5-fosfato e eritrose 4-fosfato) e (3) dois intermediários do ciclo de citrato (α -cetoglutarato e oxaloacetato) (Umbarger, 1978, Deferrari et al., 2001). A biossíntese de aminoácidos se difere dos lipídios e carboidratos, porque inclui a utilização de nitrogênio. Com relação ao catabolismo, existem várias reações envolvidas na degradação dos aminoácidos, tais como: desaminação, transaminação, desaminação oxidativa, descarboxilação, hidroxilação, hidrólise, dentre outras, e inúmeras enzimas atuando nestes processos (Wu, 2009).

O catabolismo é um processo essencial considerando que os aminoácidos presentes em excesso no organismo não podem ser armazenados, ao contrário dos ácidos graxos e da glicose, e também não podem ser excretados. O organismo utiliza os aminoácidos em excesso como combustíveis metabólicos. Neste processo, o grupamento α -amino é removido, e o esqueleto de carbono resultante é convertido em importantes intermediários metabólicos. A maior parte dos grupamentos α -amino são convertidos em ureia através do ciclo da ureia, enquanto o esqueleto de carbono pode ser transformado em acetil-CoA, acetoacetil-CoA, piruvato, ou um dos intermediários do ciclo do ácido cítrico. Deste modo, os ácidos graxos, corpos cetônicos e glicose podem ser formados a partir de aminoácidos (Berg JM, 2002, Wu, 2009).

Quadro 1. Classificação dos aminoácidos.

Nome	Símbolo	Cadeia lateral	Classificação nutricional
Glicina	Gli, Gly	Não polar, alifática	Condicionalmente essencial
Alanina	Ala	Não polar, alifática	Não essencial
Prolina	Pro	Não polar, alifática	Condicionalmente essencial
Valina	Val	Não polar, alifática	Essencial
Leucina	Leu	Não polar, alifática	Essencial
Isoleucina	Ile	Não polar, alifática	Essencial
Metionina	Met	Não polar, alifática	Essencial
Fenilalanina	Phe, Fen	Relativamente não polar, aromática	Essencial
Tirosina	Tir, Tyr	Relativamente não polar, aromática	Condicionalmente essencial
Triptofano	Trp, Tri	Relativamente não polar, aromática	Essencial
Serina	Ser	Polar, neutra	Não essencial
Treonina	Thr, The	Polar, neutra	Essencial
Cisteína	Cis, Cys	Polar, neutra	Condicionalmente Essencial
Asparagina	Asn	Polar, neutra	Não essencial
Glutamina	Gln	Polar, neutra	Condicionalmente essencial
Lisina	Lis, Lys	Básico, positivamente carregada	Essencial
Arginina	Arg	Básico, positivamente carregada	Condicionalmente essencial
Histidina	His	Básico, positivamente carregada	Essencial
Ácido Aspártico	Asp	Ácido, negativamente carregada	Não essencial
Ácido Glutâmico	Glu	Ácido, negativamente carregada	Não essencial

Adaptado de: Wu (2009); Umbarger (1978) e Nelson and Cox (2008) .

Os aminoácidos são precursores essenciais para a síntese de uma grande variedade de substâncias nitrogenadas com enorme importância biológica. Algumas destas moléculas bioativas incluem neurotransmissores (por exemplo, γ -aminobutirato (GABA), dopamina e serotonina), hormônios (por exemplo, epinefrina, norepinefrina, triiodotironina, e tiroxina), os vasodilatadores, os gases de sinalização (NO, CO, e H₂S), antioxidantes (glutathiona, creatina, melatonina, melanina e taurina), doadores de grupo metil, assim como os principais

reguladores do metabolismo, crescimento, desenvolvimento e resposta imune. O metabolismo de aminoácidos é alterado sob várias condições fisiológicas e patológicas, levando a alterações na homeostase de todo o organismo (Field et al., 2002, Wu, 2010).

Os aminoácidos estão em alta concentração no tecido cerebral, embora a sua troca entre o cérebro e o sangue seja muito rápida. Acima de 75% de todos os aminoácidos presentes no cérebro são compostos de ácido aspártico e ácido glutâmico e os seus derivados, o ácido N-acetil-aspártico e glutamina, assim como o ácido γ -aminobutírico (GABA). O conteúdo de taurina é mais elevado no cérebro, em comparação com outros tecidos, e o ácido glutâmico é o aminoácido predominante (Jakeman, 1998). As principais vias metabólicas para os aminoácidos no cérebro são semelhantes aos de outros tecidos. No entanto, o papel do sistema enzimático de ornitina ou o ciclo da ureia no sistema nervoso central não está completamente entendido porque uma importante enzima do ciclo da ureia, a carbamoil sintetase está ausente, de modo que a ureia não pode ser sintetizada neste local (Kurbat and Lelevich, 2009).

No cérebro, a comunicação inter-neuronal depende de um suprimento constante de aminoácidos neurotransmissores ou que possam funcionar como precursores para a síntese de aminas biogênicas. Dos aminoácidos neurotransmissores, o mais importante é o ácido glutâmico, que é o principal neurotransmissor excitatório no sistema nervoso de mamíferos. Ele também atua como o precursor imediato de GABA, que é o principal neurotransmissor inibitório (Yudkoff, 1997, Kurbat and Lelevich, 2009). A regulação dos níveis de ácido glutâmico é essencial para a função normal do cérebro, de modo que sua concentração extracelular anormal pode prejudicar a neurotransmissão, causar neurodegeneração e até mesmo a morte neuronal (Mangia et al., 2012).

Grande parte dos estudos voltados para a investigação da distribuição dos aminoácidos no cérebro e em fluidos biológicos durante situações de isquemia têm sido realizados em modelo murino. Estes estudos vêm apresentando que as concentrações de determinados aminoácidos no tecido cerebral permanecem relativamente constantes durante longos períodos de isquemia global, ao passo que outros mudam proporcionalmente em função do tempo e da região afetada por isquemia (Karkela et al., 1992, Pinto et al., 2014).

Um estudo realizado por Erecinska et al. (1984), demonstrou que no tecido cerebral de ratos submetidos a isquemia durante trinta minutos, houve diminuição nas concentrações de ácido glutâmico e aspartato e aumento de alanina (aminoácidos neurotransmissores). Para a categoria de aminoácidos não neurotransmissores, os aumentos foram observados em aminoácidos presentes normalmente em concentrações muito pequenas tais como tirosina, lisina, leucina, e em aminoácidos hidrofóbicos: valina, metionina e fenilalanina, que foi mais pronunciado em 2 h após a isquemia. Outro estudo desenvolvido por Jantzie et al. (2010), demonstrou que quando porcos recém-nascidos são submetidos a hipoxemia (baixa concentração de oxigênio no sangue arterial), ocorre um aumento da acidose metabólica e significativas mudanças na concentração de aminoácidos no cérebro. Após a reoxigenação, verificou-se a diminuição de ácido glutâmico e ácido aspártico e um aumento de GABA, alanina e asparagina no córtex dorsal e no gânglio basal.

Em humanos, foi demonstrado que as concentrações de aminoácidos de cadeia ramificada (leucina, isoleucina e valina) em amostras de plasma de pacientes coletadas até oito horas após o início do AVCI, analisadas por LC-MS, foram significativamente mais baixas em relação ao grupo controle. Embora não tenham sido esclarecidos os mecanismos de redução destes aminoácidos durante a isquemia, foi verificado que esta redução está associada com a gravidade do AVCI e uma pior evolução neurológica (Kimberly et al., 2013). Altas concentrações de ácido glutâmico e glicina foram observadas em plasma e líquido-cefalorraquidiano de pacientes com AVCI agudo nas primeiras 24 horas, através de LC-MS (Castillo et al., 1997). Além de existirem poucos estudos metabólicos que avaliem o perfil de aminoácidos no cérebro humano durante e após o AVCI, os mecanismos envolvidos nas diferenças de concentrações dos poucos aminoácidos estudados ainda não foram elucidados.

4.JUSTIFICATIVA

Nos Estados Unidos, os gastos diretos e indiretos com AVC, incluindo os tipos isquêmico e hemorrágico, chegaram a 36,5 bilhões de dólares apenas no ano de 2010. Considerando que o AVCI possui maior prevalência, cerca de 87% dos casos, é possível deduzir que a maior parte deste valor é aplicado no diagnóstico e tratamento deste tipo de AVC (Go et al., 2013). Estima-se que no Brasil, no período de janeiro de 2006 a maio de 2007, tenham sido gastos cerca de 326,9 milhões de dólares com atendimento e tratamento do AVCI (Christensen et al., 2009). No entanto, os impactos causados pelo AVCI não se

restringem apenas ao setor econômico, há impactos diretos e indiretos em toda esfera social. O AVCI é uma doença que quando não leva à morte, pode deixar sequelas graves como demência e paralisia, e cada vez mais têm acometido pessoas jovens que perdem sua capacidade funcional e passam a ser dependentes de familiares ou de pessoas próximas e também do governo.

Embora muitos avanços em determinadas áreas de pesquisa sobre o AVCI tenham surgido na última década, como por exemplo, o melhoramento das técnicas diagnósticas por imagem (Bang, 2009), outras áreas ainda permanecem pouco exploradas, como no caso dos estudos metabolômicos. Atualmente o maior banco de dados de metabólitos humanos o "*Human Metabolome Database*" (HMDB; <http://www.hmdb.ca/>) possui cerca de 41.828 metabólitos registrados, dentre eles estão várias classes de metabólitos de indivíduos saudáveis ou acometidos por alguma doença (Wishart et al., 2012). Uma busca recente neste banco de dados pela palavra-chave "*stroke*" (AVCI em inglês) resultou no encontro de apenas 22 metabólitos, destes apenas dois são aminoácidos. Ao contrário, quando se pesquisa pela palavra "*cancer*" (câncer, em português) mais de 371 metabólitos são encontrados. Quando pesquisamos pela expressão "*metabolic profile in stroke*" (tradução: perfil metabólico no AVCI) no site de um dos principais centros de informação, o NCBI (do inglês: *National Center for Biotechnology Information*), encontramos 253 artigos, sendo que sua maioria trata indiretamente do assunto, avalia um número mínimo de metabólitos ou estuda uma população determinada. Neste contexto, destacamos o ineditismo deste trabalho, ainda mais por usar amostras de pacientes da população brasileira, reconhecida por sua miscigenação, em busca de biomarcadores que sejam abrangentes.

Devido às altas taxas de mortalidade causadas pelo AVCI e pelo fato da doença ainda ser negligenciada em muitos países, tais como África e Brasil (Lotufo, 2005, Truelsen, 2010), salientamos ainda mais a necessidade de novos esforços e investimentos para a identificação dos metabólitos produzidos no cérebro durante e após o AVCI, para o entendimento do papel destes metabólitos na progressão da doença e para a investigação do potencial destes metabólitos como possíveis biomarcadores da doença aguda e crônica.

Conseguir um diagnóstico preciso, rápido e de baixo custo para os pacientes com suspeita de AVCI agudo é extremamente importante. Pacientes com AVCI agudo, mesmo com sintomas relativamente leves, podem ser elegíveis para o tratamento através de terapia

trombolítica ou outro meio de reperfusão cerebral, desde que o diagnóstico seja feito dentro de poucas horas depois do início dos sintomas (Whiteley et al., 2008).

A maioria dos pacientes não conseguem chegar ao hospital a tempo de receber terapias para o AVCI agudo. E mesmo aqueles pacientes que conseguem receber a terapia aguda, geralmente, ainda são acometidos por uma significativa incapacidade. De modo geral, todos os pacientes acometidos por AVCI dependem de terapias reparadoras e restauradoras. Várias intervenções que objetivam a restauração de áreas lesionadas do cérebro estão sendo estudadas, dentre elas, podemos citar o uso de fatores de crescimento, células-tronco, biomoléculas, próteses neurológicas, estimulação cerebral eletromagnética e estratégias cognitivas, tais como imagética motora (simulação mental de um ato motor) (Milot and Cramer, 2008). Neste contexto, fica clara a importância das pesquisas também para a descoberta de biomarcadores de fase crônica do AVCI. A melhor compreensão dos eventos moleculares que ocorrem durante o processo de recuperação do AVCI podem ser úteis para otimizar o uso de terapias restauradoras, evitar reincidências e melhorar a qualidade de vida do paciente (Milot and Cramer, 2008, Burke and Cramer, 2013).

A utilidade de um biomarcador é definida por sua capacidade de melhorar a tomada de decisão clínica e por adicionar informações oportunas que contribuam e complementem os exames clínicos e de imagem. Este objetivo não foi totalmente alcançado ainda por quaisquer biomarcadores, mas os dados disponíveis são promissores e novos estudos devem ser encorajados (Katan and Elkind, 2011).

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo geral

Pesquisar, identificar e caracterizar o perfil de aminoácidos presentes no plasma de pacientes com AVCI crônico em busca de novos biomarcadores que possam contribuir para o entendimento da fisiopatologia da doença, para o seu diagnóstico e prognóstico.

5.2 Objetivos específicos

- Padronização das condições de análise, identificação e quantificação de aminoácidos presentes no plasma de pacientes com AVCI usando GC-MS;

- Caracterizar o perfil de concentração de aminoácidos em cada subtipo de AVCI;
- Investigar possíveis diferenças nas concentrações de aminoácidos em amostras de pacientes com AVCI em relação ao grupo controle;
- Investigar o potencial de um painel de 16 aminoácidos em diferenciar os subtipos de AVCI em relação uns aos outros e em relação ao grupo controle;

6 METODOLOGIA

Esta pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Química Analítica do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e no Laboratório de Sinalização Celular e Nanotecnologia do Departamento de Bioquímica e Imunologia, do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Todos os procedimentos realizados durante o estudo foram analisados e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG, sob o parecer n.º 312840 (Anexo A). Também foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte (SCMBH), onde os pacientes foram recrutados para participarem do estudo, sob o parecer n.º 315034 (Anexo B). Todos os pacientes recrutados ou seus responsáveis diretos foram informados sobre o estudo e concordaram em participar, assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndices A, B e C). Esta dissertação foi escrita de acordo com as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) e em conformidade com a resolução de n.º 05/2014 do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular da UFMG que estabelece os requisitos e procedimentos para defesa de tese/dissertação.

6.1 Grupo de estudos/ amostras biológicas

O presente estudo utilizou amostras biológicas do banco repositório do laboratório de biomarcadores do Instituto de Pesquisa da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte (IEP-SCBH). As amostras foram coletadas no Ambulatório de Neurologia do Centro de Especialidades Médicas (CEM) em Belo Horizonte, Minas Gerais.

Foram coletadas amostras de sangue venoso dos pacientes recrutados em tubos do sistema Vacuette[®] (Vacuette[®] do Brasil LTDA, Campinas, SP) contendo o anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). As amostras de sangue total foram centrifugadas à

3000rpm por 15 minutos sob temperatura ambiente para a obtenção do plasma. O plasma foi armazenado a -80°C até o momento de uso.

No presente estudo foram analisadas 89 amostras. Dessas amostras, 16 eram de pacientes que nunca tiveram nenhum subtipo de AVCI ou AVC hemorrágico, que foram designados como indivíduos saudáveis e incluídos no grupo controle. Os demais 73 pacientes foram diagnosticados com algum dos subtipos de AVCI através de imagem por ressonância magnética (IRM), baseado nos critérios do sistema de classificação "*Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment*" (TOAST) e se encontravam na fase crônica da doença. Os dados demográficos estão apresentados na **Tabela 1**. Foram excluídos do estudo pacientes com doenças degenerativas crônicas, cardiopatia chagásica, doença tireoidiana, doença renal crônica, tumores malignos, traumas e alcoólatras.

Tabela 1. Dados demográficos do grupo de estudos

Amostras (n=89)	Gênero		Idade*
	Mulheres	Homens	
Controles =16	9	7	54,75 (\pm 12,34)
Aterotrombótico=20	7	13	68,70 (\pm 8,09)
Cardioembólico=18	11	7	62,50 (\pm 12,15)
Lacunar=20	10	10	64,20 (\pm 11,28)
Indeterminado=15	7	8	54,93 (\pm 14,50)

* Média das idades e desvio padrão entre parênteses ().

6.2 Extração dos aminoácidos das amostras de plasma

O protocolo para extração dos aminoácidos foi adaptado do trabalho realizado por A et al. (2005). Para a precipitação de proteínas e extração dos metabólitos, as amostras de plasma foram tratadas com metanol gelado (-10°C), na proporção de 100µL de plasma para 900µL de metanol. Após, as amostras foram agitadas em vórtex durante um minuto e, em seguida, centrifugadas a 10 000rpm durante 10 minutos sob temperatura ambiente. Foram transferidos 100µL do sobrenadante de cada amostra para um *vial* (frasco pequeno com capacidade para 2 mL) de vidro que, em seguida, foi deixado aberto, sob temperatura ambiente, até a fração líquida da amostra secar totalmente. Após a evaporação, seguiu-se com o processo de derivatização das amostras.

6.3 Derivatização das amostras

O processo de derivatização das amostras foi realizado conforme descrito por de Paiva et al. (2013). Em cada *vial* contendo a amostra, após a evaporação, foi acrescentado 15µL de uma solução de metoxamina (Fluka - St. Louis, MO, EUA) diluída em piridina (St. Louis, MO, EUA) na concentração de 20mg/mL, seguido por 35µL de BSTFA (N, O-bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide) + TMCS (Trimethylchlorosilane - St. Louis, MO, EUA). Em seguida, cada *vial* foi agitado em vórtex durante 30s e submetido à irradiação por micro-ondas durante 3 minutos, usando um equipamento doméstico com potência de 700W (Philco, SP, Brasil). Após a derivatização, o *vial* foi retirado do micro-ondas e agitado por 10s em vórtex. Em seguida, usando uma microsseringa de vidro com haste inoxidável, com capacidade para 10µL (Hamilton, Série 7000), foi retirado 1µL da amostra e injetado manualmente no cromatógrafo. Todas as condições de extração e derivatização das amostras foram previamente padronizadas.

6.4 Condições cromatográficas e de espectrometria de massas

A análise do perfil de aminoácidos foi realizada através da técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS), com algumas adaptações no método descrito por de Paiva et al. (2013). As análises foram realizadas em um equipamento Shimadzu (Kioto, Japão), modelo GC-2010/QP-2010, com analisador de massas de alta performance do tipo quadrupolo. O espectrômetro de massas foi operado no modo de impacto de elétrons (EI) a 70 elétron-volt (eV).

Para a separação dos analitos, o cromatógrafo foi equipado com uma coluna capilar de sílica fundida, apolar, da marca Restek (Bellefont, PA, EUA), modelo Rtx-5MS (30m x 0.25mm, id. x 0.25µm) contendo 5% de difenil e 95% dimetilpolisiloxano. Com o objetivo de obter uma melhor resolução cromatográfica, considerando que a matriz utilizada para as análises realizadas neste estudo é mais complexa (metabólitos do plasma) do que a utilizada no método original (metabólitos do líquido cefalorraquidiano) descrito por de Paiva et al. (2013), foram feitas modificações na rampa de temperatura para o forno da coluna e foi aumentado o tempo de análise da amostra. A programação de temperatura usada para o forno da coluna foi a seguinte: inicialmente 80°C por 2 minutos, subindo para 120°C a uma taxa de 3°C por minuto, subindo para 190°C a 8°C por minuto, subindo para 300°C a 30°C por

minuto e permanecendo a 300°C por 3 minutos. O tempo total da análise foi de 29,75 minutos.

O injetor foi operado a 280°C no modo *splitless*¹ durante 3 minutos, seguido por uma razão de *split*² de 1:20. Foi utilizado gás Hélio com a pureza de 99,999% como gás de arraste, com um fluxo de 1mL/min. A temperatura da fonte de íons foi de 200°C e a interface do GC-MS foi mantida a 260°C. As análises foram realizadas no modo *full scan* (varredura completa), monitorando a faixa de massas de 45-300 *m/z*, e no modo *SIM* (do inglês: *single ion monitoring*; monitoramento de íons únicos), para a seleção de íons específicos para a identificação e quantificação. A aquisição de sinal e o processamento dos dados foram realizados utilizando o *software* Shimadzu LabSolutions (Kyoto, Japão).

6.5 Identificação e quantificação dos aminoácidos

O processo de padronização do método para identificação e quantificação dos aminoácidos presentes no plasma de pacientes com AVCI foi descrito por de Paiva et al. (2013) e adaptado para o uso neste estudo. Para a validação do método foram usados padrões comerciais dos seguintes aminoácidos: L-alanina, L-glicina, sarcosina, L-valina, L-leucina, L-isoleucina, L-serina, L-treonina, L-ácido aspártico, L-metionina, L-prolina, L-cisteína, L-ácido glutâmico, L-fenilalanina, L-asparagina e L-lisina, adquiridos da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). As soluções-padrão para cada um dos aminoácidos foram preparadas em uma concentração inicial de 1,0mg/mL em água e armazenadas a -20°C. A partir destas soluções foram preparadas as soluções de trabalho em diferentes concentrações para a preparação das curvas analíticas para cada aminoácido. Estas soluções foram armazenadas em geladeira, sob a temperatura de 4°C, até o momento de uso. Para a identificação e quantificação, as soluções de trabalho foram diluídas nas concentrações de interesse e, em seguida, foram derivatizadas e injetadas conforme descrito no item 6.3 (Derivatização das amostras).

A identificação de cada aminoácido foi realizada através da análise de fragmentos por *m/z*, tempo de retenção e abundância específica nas soluções de padrões derivatizadas, seguida pela análise de similaridade com os espectros de massas da biblioteca de espectros

¹ *Splitless*: modo de injeção em que a maior parte da amostra vaporizada é inserida para o interior da coluna.

² *Split*: modo de injeção que reduz e controla a quantidade de amostra que entra na coluna. A razão de *split* 1:20 significa que 1µL da amostra foi diluído em 20µL do gás de arraste.

presente no *software* do equipamento. Para a quantificação dos aminoácidos foi adotado o método de calibração externa, onde foi comparada a área do pico dos aminoácidos presentes na amostra com as áreas obtidas dos mesmos aminoácidos nas soluções padrão, com concentrações conhecidas. Os íons específicos usados para quantificação de cada aminoácido estão listados na **Tabela 2**.

Foram construídas no programa Excel (Microsoft, EUA) curvas analíticas para cada aminoácido. Para a construção da curva, foram usadas cinco concentrações diferentes de cada solução padrão. A área do pico do referente ao íon escolhido para quantificação foi registrada para cada concentração e foi traçado um gráfico de área versus concentração. Através da equação da reta $y = a + bx$, foram obtidos o coeficiente angular **a** e o coeficiente de regressão linear **b**. A concentração dos aminoácidos presentes nas amostras foi determinada em $\mu\text{mol/L}$, usando o seguinte cálculo:

$$(a) \text{Área do pico} + \mathbf{b/a} * (1000/\text{Massa molar do aminoácido}) * \text{diluição da amostra}$$

Também foram calculados os coeficientes de correlação **r** para cada curva analítica, de modo que todas as curvas apresentaram coeficientes de correlação acima de 0,99. Os valores dos coeficientes obtidos das curvas analíticas e a massa molar de cada aminoácido estão listados no Apêndice D. As áreas dos picos registradas para cada aminoácido presentes nas amostras de AVCI estão disponíveis no Apêndice E.

Tabela 2. Tempo de retenção, íons (m/z) e abundância específicos para cada L-aminoácido

N.º	Aminoácidos	Tempos de Retenção em minutos*	Íons (m/z) para identificação e abundância (%)	Íons (m/z) para quantificação
1	L-alanina	8,51 ± 0,03	116(100)+73(53,6)	116
2	L-glicina	9,35 ± 0,03	102(100)+73(68,4)	102
3	Sarcosina	12,22 ± 0,02	116(100)+73(52,0)	116
4	L-valina	12,29 ± 0,02	144(100)+73(40,6)	144
5	L-leucina	14,40 ± 0,02	158(100)+73(42,4)	158
6	L-isoleucina	15,25 ± 0,02	158(100)+73(50,4)	158
7	L-serina	17,60 ± 0,02	73(100)+204(75,2)	204
8	L-treonina	21,83 ± 0,02	73(100)+218(46,0)	218

9	L-metionina	21,9 ± 0,02	176(100)+128(60,0)	176
10	L-ácido aspártico	20,24 ± 0,02	73(100)+232(68,4)	232
11	L-prolina	21,15 ± 0,02	156(100)+73(53,6)	156
12	L-cisteína	22,15 ± 0,02	73(100)+220(88,8)	220
13	L-ácido glutâmico	22,99 ± 0,03	246(100)+128(32,4)	246
14	L-fenilalanina	23,00 ± 0,02	218(100)+192(71,2)	218
15	L-asparagina	23,75 ± 0,03	116(92,40)+231(51,2)	231
16	L-lisina	24,45 ± 0,03	84(100)+156(55,6)	156

* média ± desvio padrão (n=10). Adaptado de de Paiva et al. (2013).

6.6 Análises estatísticas

O primeiro passo foi analisar se os dados de concentração dos aminoácidos presentes nas amostras seguiam uma distribuição normal. Para tanto, os resultados foram submetidos ao teste de *Kolmogorov-smirnov*, utilizando o *software* SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Após a verificação da distribuição da amostra como sendo não normal, foi realizado o teste de *Mann-Whitney* para a comparação de cada grupo de amostras pertencentes a um subtipo de AVCI com o grupo controle. Para a realização deste teste e a elaboração dos gráficos foi utilizado o *software* GraphPadPrism6 (*GraphPad software*, Inc., CA, EUA). O teste de *Mann-Whitney*, também conhecido como teste U, é indicado para a comparação de dois grupos não pareados com a finalidade de verificar se pertencem ou não à mesma população. Na verdade, verifica-se se há evidências para acreditar que valores de um grupo A, por exemplo, são superiores ao de um grupo B (Nachar, 2008).

Para a análise de separação entre os subtipos de AVCI e a identificação de potenciais biomarcadores dentre os 16 aminoácidos analisados, foram utilizadas as análises estatísticas multivariadas: análise discriminante com calibração multivariada por mínimos quadrados (do inglês: *Partial Least Squares-Discriminant Analysis*, PLS-DA) e algoritmos de aprendizado de máquina SVM (do inglês: *support vector machines*). Juntamente, também foi aplicado o algoritmo de Seleção dos Preditores Ordenados (do inglês: *Ordered Prediction Selection*, OPS) com o objetivo de selecionar as variáveis com maior potencial para serem biomarcadores da doença. Para o desenvolvimento dos modelos estatísticos foi usado o *software* MATLAB (*The MathWorks*, Inc., MA, EUA).

O PLS-DA é um dos métodos de reconhecimento de padrões supervisionado mais amplamente utilizado em estudos metabolômicos quando se deseja separar classes (Ramadan et al., 2006, Worley and Powers, 2013). A regressão por PLS-DA é uma técnica de análise de dados multivariados utilizada para relacionar variáveis categóricas dependentes (Y) com diversas variáveis independentes (X). Neste trabalho, a matriz X foi construída contendo os valores de concentração dos 16 aminoácidos analisados por GC-MS e a matriz (Y) formada pela categorização dos subtipos de AVCI (por exemplo, Y pode ser um vetor com os valores de -1 e 1, onde cada amostra pertencente à classe dos controles pode ser representada por -1 e 1 representa cada amostra pertencente à classe dos casos) (Szymanska et al., 2012). Um exemplo esquemático de uma matriz de dados está representada na **figura 10**.

Amostras	Y		Variáveis (matriz X)						
	1	-1	Alanina	Glicina	Sarcosina	Valina	Leucina	Isoleucina
Controle 01	1		213,71	21,19	281,45	28,16	12,50	10,13	
Controle 02	1		87,34	22,51	15,11	38,42	13,45	10,14	
Controle 03	1		359,86	23,34	15,07	37,11	12,35	10,24	
Controle 04	1		109,61	22,28	14,48	51,18	12,60	10,41	
Lacunar 01		-1	190,54	20,68	16,26	26,03	19,75	10,08	
Lacunar 02		-1	32,98	19,71	16,73	21,38	16,83	10,13	
Lacunar 03		-1	49,84	23,28	16,95	26,09	19,00	13,58	
Lacunar 04		-1	93,32	27,55	22,42	88,06	51,53	10,34	

Vetores ↓

Figura 10. Representação esquemática de uma matriz de dados para análise por PLS-DA. Cada coluna da matriz X corresponde a um vetor. Os valores representados são meramente ilustrativos.

Neste estudo, os dados utilizados para a construção da matriz foram previamente processados através de autoescalamento. O processamento por autoescalamento consiste em centrar na média os valores de cada coluna da matriz e em seguida dividi-los pelo valor do desvio padrão. Este passo é importante para homogeneizar os dados que estejam em diferentes unidades e variáveis com diferentes variâncias, de tal modo que eles possam ter uma distribuição adequada para a análise (Tobias, 1999).

O SVM-DA é um método relativamente novo de aprendizado de máquina supervisionado para a classificação de dados. O princípio básico do SVM-DA consiste em: dado um conjunto de dados com duas classes, um classificador linear ótimo é construído de modo a maximizar a margem de separação entre as classes de dados. Para determinar a

margem, dois hiperplanos paralelos são construídos (Vapnik, 2006). A margem de um classificador é definida como a largura máxima em ambos os lados antes de atingir um dos pontos de dados. Os pontos que definem essa margem são chamados de "vetores de suporte" (**Fig. 11**). O SVM-DA é um classificador linear capaz de encontrar um hiperplano que maximize as fronteiras entre classes, esta característica faz com que o SVM-DA seja uma ferramenta poderosa para tarefas de reconhecimento de padrões (Li et al., 2008, Mahadevan et al., 2008).

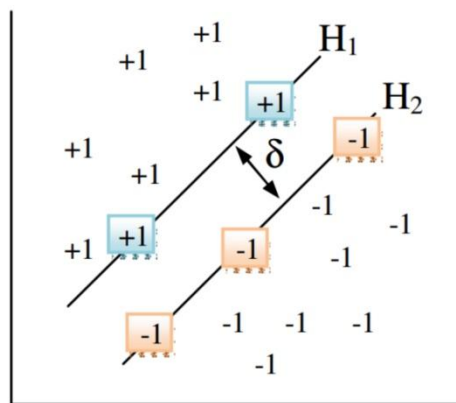


Figura 11. Formação do hiperplano de separação através dos vetores de suporte. Neste exemplo esquemático, o SVM-DA encontra um único hiperplano como uma margem de separação máxima denotada por δ . A linha H_1 define a fronteira para os objetos da classe +1, enquanto H_2 define a fronteira para os objetos da classe -1. Os objetos que estão na fronteira, marcados em laranja e azul, são denominados vetores de suporte.

Os modelos estatísticos gerados através dos dois métodos empregados, PLS-DA e SVM-DA, foram primeiramente construídos usando todas as variáveis latentes³ obtidas a partir da matriz de dados e, em seguida, foram validados através de validação cruzada. Nos modelos construídos usando seleção de variáveis, primeiramente foi aplicado o algoritmo OPS para a seleção de variáveis e as variáveis selecionadas foram utilizadas para a construção dos modelos que, em seguida, também foram validados através de validação cruzada. Durante o processo de validação cruzada são calculados os parâmetros estatísticos para avaliar em que situação o modelo apresentou maior capacidade de previsão/classificação. Neste estudo foi calculada a raiz do erro quadrático médio de validação cruzada (RMSECV) e o erro de classe. Quanto menor o RMSECV e o erro de classe melhor é a qualidade de previsão/classificação do modelo (Teófilo, 2007).

³ Variável latente: também pode ser designada como componente principal ou fator. É o vetor que descreve a máxima variância em um conjunto de dados.

A seleção de variáveis por OPS é uma técnica que ajuda a identificar um subconjunto de variáveis que são, para um dado problema, as mais úteis para um modelo de regressão preciso e exato. De forma geral, o objetivo do algoritmo OPS é obter um vetor informativo que contém informações como a localização das variáveis com melhor resposta para a predição/classificação (Teófilo et al., 2009).

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 Concentração de aminoácidos em amostras de plasma de pacientes com AVCI crônico

Neste estudo analisamos a concentração de 16 aminoácidos (**Tabela 3**) em amostras de plasma de pacientes com algum dos quatro subtipos de AVCI em fase crônica (aterotrombótico, cardioembólico, lacunar e indeterminado), e de um grupo de indivíduos considerados saudáveis que nunca apresentaram nenhum tipo de AVCI. O método de análise desenvolvido por de Paiva et al. (2013) para a detecção destes aminoácidos demonstrou alta eficiência para a análise de uma matriz de metabólitos extraídos de líquido cefalorraquidiano através de GC-MS. No presente estudo, usando o mesmo método, com algumas adequações, ficou comprovada a eficiência do método também para a análise de uma matriz de metabólitos extraída de um tipo de amostra mais complexa: o plasma sanguíneo. A **figura 12** apresenta um cromatograma de uma amostra de AVCI, onde é possível observar os picos dos 16 aminoácidos detectados, posicionados de acordo com seus respectivos tempos de retenção.

As concentrações de aminoácidos no plasma são mantidos relativamente constantes em estado pós-absortivo em indivíduos adultos saudáveis. No entanto, os níveis circulantes de aminoácidos sofrem mudanças durante o período neonatal, em condições catabólicas e de doença (Wu, 2009). Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que existe uma variação sutil, porém de grande importância, entre as concentrações de aminoácidos no plasma de pacientes com AVCI e indivíduos controle. Considerando que a concentração total de aminoácidos livres no plasma sanguíneo é de aproximadamente 2,5mM, e que grande parte dessa concentração se deve a presença de glutamina, é notável que a concentração dos demais aminoácidos é demasiadamente pequena (Brosnan, 2003). Além disso, o organismo possui mecanismos de catálise e de regulação da síntese de aminoácidos, que é de fundamental importância para manter a homeostase. Tendo em vista estes fatores, não era esperado

encontrar grandes variações na concentração de aminoácidos. Desta forma, destacamos a escolha apropriada da técnica de GC-MS, devido à sua alta sensibilidade, e do método que demonstrou uma capacidade de detecção mínima de 0,01µmol/L de aminoácidos (de Paiva et al., 2013, Pinto et al., 2014).

Através da comparação entre os grupos, usando o teste de *Mann-Whitney*, encontramos diferenças estatisticamente significativas na concentração de determinados aminoácidos para alguns subtipos de AVCI. Aqui discutiremos apenas os resultados que apresentaram significância estatística.

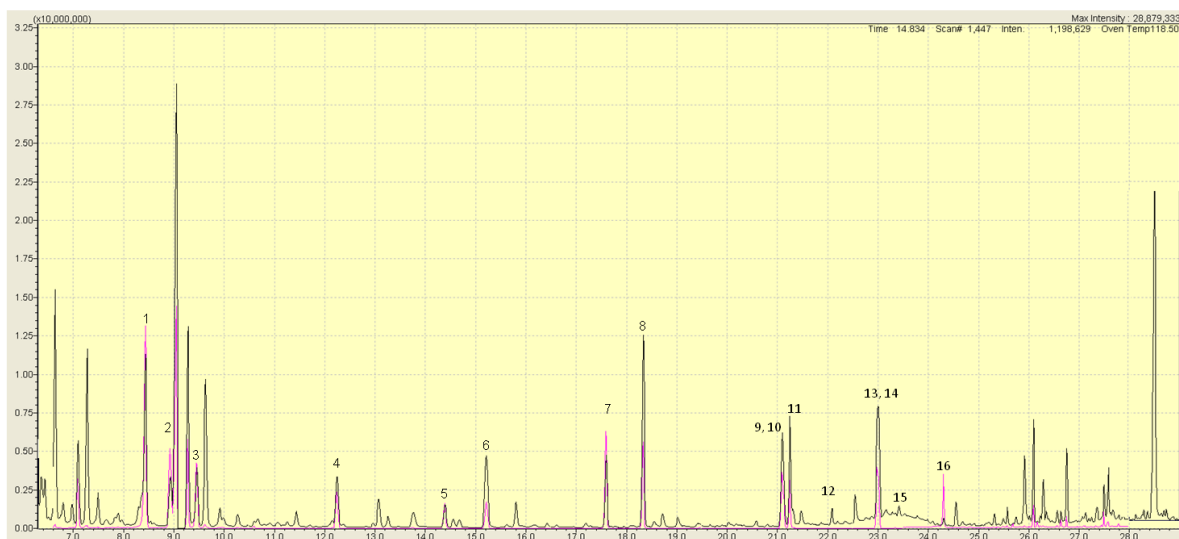


Figura 12. Cromatograma. Exemplo de perfil cromatográfico obtido pela análise de uma amostra de plasma de paciente com AVCI, demonstrando a presença de 16 aminoácidos. (1) Alanina; (2) Glicina; (3) Sarcosina; (4) Valina; (5) Leucina; (6) Isoleucina; (7) Serina; (8) Treonina; (9) Metionina; (10) Prolina; (11) Ácido aspártico; (12) Cisteína; (13) Ácido glutâmico; (14) Fenilalanina; (15) Asparagina; e (16) Lisina. Eixo "x" corresponde ao tempo em minutos e o eixo "y" corresponde à intensidade.

Como resultados, encontramos que o subtipo aterotrombótico apresentou valores de concentração superiores ao grupo controle para a Leucina (Box 9:A) e Prolina (Box 12:A), e concentrações inferiores para o ácido glutâmico (Box 2:A), alanina (Box 3:A), fenilalanina (Box 6:A), lisina (Box 10:A) e metionina (Box 11:A). O subtipo lacunar apresentou concentrações superiores ao grupo controle para a fenilalanina (Box 6:D), Leucina (Box 9:D) e Prolina (Box 12:D), e concentração inferior para a metionina (Box 11:D). O subtipo indeterminado apresentou o mesmo perfil que o subtipo lacunar com concentrações superiores para a fenilalanina (Box 6:C), Leucina (Box 9:C) e Prolina (Box 12:C), e concentração

inferior para metionina (Box 11:C). O subtipo cardioembólico não demonstrou diferenças estatisticamente significantes para nenhum dos 16 aminoácidos analisados.

Sumarizando, os aminoácidos prolina, leucina e fenilalanina estão em maior concentração em relação ao grupo controle nos subtipos de AVCI lacunar e indeterminado. A prolina e leucina também apresentaram maiores concentrações no subtipo aterotrombótico. Já a metionina aparece em concentrações inferiores nos três subtipos de AVCI acima citados. A princípio, é possível observar uma similaridade de perfil entre as amostras dos três subtipos de AVCI que as diferencia do grupo controle. Dos quatro aminoácidos que compõem este perfil, três são classificados como essenciais (não são sintetizados pelo organismo humano): metionina, fenilalanina e leucina, e um é condicionalmente essencial (sintetizado pelo organismo humano, mas sob certas condições é necessário suplementação): a prolina. Uma possível justificativa para explicar a presença aumentada de aminoácidos essenciais no plasma seria o catabolismo de proteínas. Em contrapartida, a diminuição, como no caso da metionina, pode estar atrelada ao seu uso como precursora de outros metabólitos.

Com relação ao aumento da concentração de prolina no plasma de pacientes com AVCI, uma possível justificativa seria sua liberação a partir da degradação de matriz extracelular (principalmente da degradação de colágeno) no cérebro e da disrupção da barreira hematoencefálica, causada pela ativação de metaloproteinase durante a isquemia (Wyse and Netto, 2011). Em um estudo desenvolvido por Pandhare et al. (2009) foi demonstrado que em situações de baixo suprimento de energia, como ocorre no AVCI, a via metabólica da prolina é ativada como uma estratégia de sobrevivência celular. Durante o estresse nutricional, a prolina é facilmente obtida pela degradação da matriz extracelular e esta degradação pode resultar na geração de ATP. Após a liberação de prolina pela ação enzimática das metaloproteinases sobre o colágeno, a prolina é oxidada em Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato (P5C) que é catalisada pela oxidase de prolina (POX), que é uma enzima da membrana interna mitocondrial. Esta conversão de prolina a P5C resulta na geração de elétrons que são doados para a cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria para gerar ATP (**Fig.13**) (Phang, 1985).

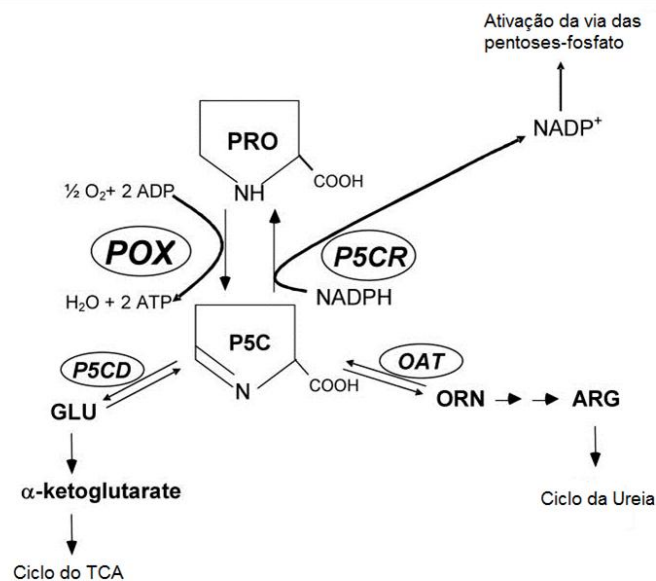


Figura 13. Representação esquemática do metabolismo da prolina (PRO). O primeiro passo para a degradação de prolina é sua conversão em $\Delta 1$ -pirrolina-5-carboxilato (P5C), pela enzima prolina oxidase (POX). P5C pode ser reduzido novamente a prolina por P5C-redutase (P5CR) ou pode ser convertido para o glutamato (ou ácido glutâmico) pela enzima, pirrolina-5-carboxilato de desidrogenase (P5CD) e pode entrar no ciclo do TCA, ou alternativamente ele pode ser convertido em ornitina pela ornitina aminotransferase (OAT) e pode entrar no ciclo da ureia. Adaptado de Pandhare et al. (2009).

O tratamento dos pacientes com o ativador de plasminogênio (t-PA) também pode contribuir indiretamente para a liberação de prolina, o t-PA é uma enzima que converte o plasminogênio em plasmina (Jin et al., 2010b). A plasmina pode degradar diretamente várias moléculas da matriz extracelular, bem como ativar e aumentar a secreção de metaloproteinases (Lee et al., 1996, Hermann and Matter, 2007).

Vários trabalhos têm demonstrado que os aminoácidos de cadeia ramificada (leucina, isoleucina e valina), particularmente a leucina, têm um importante papel como doadores de grupo amino para a síntese de ácido glutâmico no cérebro (Fernstrom, 2005). Esses aminoácidos possuem alta capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica e a leucina, especificamente, consegue atravessar mais rapidamente do que qualquer outro aminoácido (Oldendorf, 1971, Smith et al., 1987, Yudkoff, 1997). Em um estudo realizado para explorar o papel da leucina como precursora de ácido glutâmico/glutamina, uma cultura de astrócitos foi incubada com leucina marcada com isótopo de nitrogênio. Neste estudo foi verificado que 25 a 30% do nitrogênio presente no ácido glutâmico/glutamina sintetizado nos astrócitos eram oriundos da leucina marcada (Yudkoff et al., 1994). Nos astrócitos, a leucina doa um grupamento amino para o α -cetoglutarato para a produção de ácido glutâmico que é

convertido em glutamina pelas células gliais. O esqueleto de carbono da leucina é convertido em α -cetoisocaproato, que, como a glutamina é liberado para o meio extracelular. O α -cetoisocaproato é recaptado pelos neurônios que, por meio de uma reversão da transaminase, regenera a leucina em um processo em que há o consumo de ácido glutâmico. A leucina recém-formada, então, é liberada para o meio extracelular, a partir do qual pode ser novamente utilizada por astrócitos, completando o ciclo leucina-ácido glutâmico (**Fig.14**) (Daikhin and Yudkoff, 2000). Nos neurônios, este ciclo proporciona um mecanismo "tampão" para o ácido glutâmico, principalmente quando existe um excesso deste neurotransmissor (Yudkoff, 1997), como é o que ocorre durante a cascata isquêmica no AVCI. O aumento da concentração de leucina no plasma de pacientes com AVCI pode estar relacionado com este mecanismo.

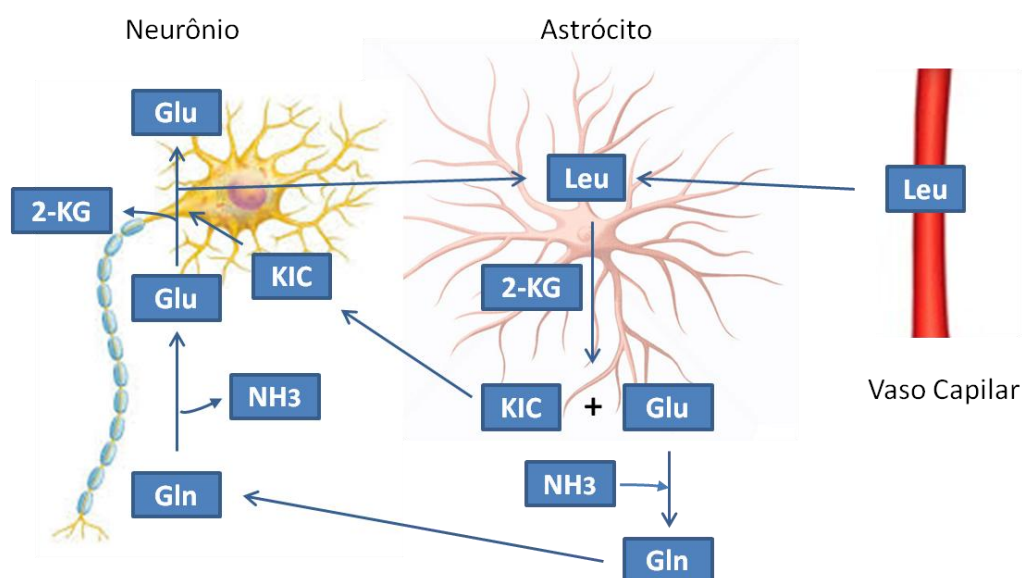


Figura 14. Modelo hipotético do ciclo "leucina-ácido glutâmico" no cérebro. De acordo com este modelo putativo, a leucina presente no sangue periférico é rapidamente transportada para dentro dos astrócitos, onde é transaminada com 2-oxo-glutarato (2-KG) para formar ácido glutâmico e 2-oxo-cetoisocaproato (KIC), o cetoácido de leucina. O ácido glutâmico é convertido em glutamina via glutamina sintetase astrocítica. Nos neurônios, a glutamina é convertida em ácido glutâmico. O KIC também é liberado para os neurônios, onde poderá ser transaminado com o ácido glutâmico para produzir leucina. Esta última é transportada de volta para os astrócitos, completando o ciclo funcional. Fonte: Adaptado de Daikhin and Yudkoff (2000).

Embora não tenham sido encontrados relatos na literatura sobre o aumento ou diminuição da concentração de fenilalanina em plasma de pacientes com AVCI, alguns estudos têm apontado que este aminoácido está aumentado em doenças com ativação imune crônica e inflamação. Em condições fisiológicas a fenilalanina é convertida em tirosina pela enzima fenilalanina hidroxilase (PAH). Para realizar a conversão, esta enzima depende da

doação de um hidrogênio oriundo de um cofator não proteico chamado tetrahidrobiopterina (BH4) (Neurauter et al., 2008). A ativação do sistema imune é acompanhada pelo aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), que durante a cascata isquêmica no AVCI já é exacerbada por outros mecanismos. Já foi demonstrado que durante o estresse oxidativo, o cofator BH4 e seus derivados são facilmente oxidados e inativados, o que impede a ativação da enzima PAH, e conseqüentemente a conversão da fenilalanina em tirosina (Widner et al., 2001). O aumento de fenilalanina no sangue, através deste mecanismo, já foi relatado em casos de pacientes infectados com HIV, câncer, trauma e queimaduras (Watanabe et al., 1984, Roth et al., 1985, Rath et al., 1987, Ollenschlager et al., 1988). Em um estudo realizado por Erecinska et al. (1984) foi demonstrado que em tecido cerebral de ratos submetidos à isquemia durante um período de duas horas, houve um aumento significativo de fenilalanina, chegando a valores três vezes maiores em relação ao grupo controle. Em humanos, um estudo desenvolvido por Karkela et al. (1992) demonstrou que a fenilalanina apresentou altas concentrações em líquido cefalorraquidiano de pacientes com isquemia cerebral global causada pelo infarto do miocárdio, permanecendo alta até 76 horas após o infarto.

Alguns estudos têm demonstrado que a fenilalanina e seus derivados endógenos, tais como a 3,5- dibromo-L-tirosina (DBrT) e a 3,5- diiodo-L-tirosina (DIT), têm apresentado um papel neuroprotetor promovendo a diminuição da neurotoxicidade causada pela excessiva liberação de ácido glutâmico durante a isquemia. A fenilalanina, através de três mecanismos distintos, é capaz de mediar a depressão da transmissão sináptica glutaminérgica, são eles: (1) a competição pelo sítio de ligação de glicina nos receptores NMDA; (2) a competição pelo sítio de ligação do ácido glutâmico nos receptores AMPA; e (3) através da atenuação da liberação do ácido glutâmico. Os derivados endógenos da fenilalanina, DBrT e DIT atuam de maneira similar ao seu precursor, porém, com uma potência maior (Glushakov et al., 2003, Kagiya et al., 2004).

A metionina, um aminoácido utilizado na formação de várias proteínas, é também precursora de inúmeras outras moléculas bioquímicas. A metionina é convertida através da enzima metionina-adenosiltransferase (MAT) em S-adenosilmetionina (SAME), que é a principal coenzima doadora de grupamentos metil no organismo. A metilação por SAME é uma passo crítico na estabilização de muitas proteínas, incluindo a mielina. Dentre outras funções, a metilação também é importante para a proteção e estabilização das moléculas de DNA e influencia na transcrição gênica. Além disso, a SAME está envolvida na formação de

poliaminas e no metabolismo de serotonina e niacinamida (Miller, 2003). Outro papel importante da metionina é atuar como precursora da homocisteína. Quando a SAME transfere seu grupo metil para um aceptor, a S-adenosilhomocisteína é formada. A hidrólise da S-adenosilhomocisteína pela S-adenosilhomocisteína hidrolase (SAH) leva à formação de homocisteína e adenosina (Finkelstein, 1990).

Em nosso estudo observamos que a concentração de metionina foi menor em relação ao grupo controle nos subtipos de AVCI aterotrombótico, lacunar e indeterminado. Embora em nosso estudo não tenha sido investigada a concentração de homocisteína, já é bem descrito que existe um aumento da concentração de homocisteína no plasma de pacientes com doenças vasculares oclusivas, bem como em pacientes com AVCI dos subtipos aterotrombótico e lacunar (McCully, 1969, Brattstrom et al., 1992, Tehlivets, 2011). A diminuição da concentração de metionina no plasma de pacientes com AVCI, encontrada no presente estudo, pode estar relacionada com a conversão deste aminoácido em homocisteína.

Neste estudo também foi encontrado uma diminuição dos aminoácidos alanina e lisina no plasma de pacientes com o subtipo de AVCI aterotrombótico. Karkela et al. (1992) analisaram a concentração de alanina em líquido cefalorraquidiano de pacientes após o AVCI e verificaram que os níveis da alanina subiram gradativamente dentro das primeiras quatro horas e, em seguida, houve um rápido declínio. Em um estudo desenvolvido por Waagepetersen et al. (2000), usando cultura de neurônios e astrócitos, foi demonstrado que a alanina tem um importante papel como transportadora de nitrogênio dos neurônios glutamatérgicos para os astrócitos. Verificou-se que existe uma síntese preferencial e liberação de alanina em neurônios glutamatérgicos e a captação de alanina em astrócitos. Deste modo, foi proposto que este transporte através de alanina pode operar de modo a fornecer amônia para a síntese de glutamina em astrócitos e dispor da amônia gerada pela reação de glutaminase em neurônios glutamatérgicos, formando um ciclo. Nos casos de AVCI, ocorre uma desregulação dos processos celulares cerebrais, de modo que podemos inferir que não seja possível a síntese de alanina pelos neurônios glutamatérgicos, uma vez que, para que esta síntese ocorra é necessário que haja concentrações adequadas de piruvato derivado do lactato ou da glicose nos neurônios.

No presente estudo, observamos uma menor concentração de lisina no plasma de pacientes com AVCI do subtipo aterotrombótico. Embora o papel da lisina no AVCI ainda

não tenha sido elucidado, seu papel na etiologia do subtipo aterotrombótico vem sendo discutido. Um dos principais componentes que formam a placa aterosclerótica é a lipoproteína (a), um tipo de colesterol que possui alta afinidade por lisina. Normalmente as placas ateroscleróticas se formam nas artérias em locais com alta pressão mecânica, como nas bifurcações e em áreas de movimento como, por exemplo, na superfície do coração. Nestas regiões, há uma probabilidade maior de ocorrer degradação das paredes das artérias, e uma subsequente degradação de colágeno. A degradação do colágeno resulta na exposição dos resíduos de lisina que ficam disponíveis para a ligação com seus receptores presentes na lipoproteína (a). Deste modo, é iniciado o processo aterosclerótico (Boonmark et al., 1997). Ao longo do tempo, as placas podem aumentar e estreitar o diâmetro interno da artéria causando um bloqueio do fluxo sanguíneo, bem como a placa pode se desestabilizar e se soltar formando um trombo que pode levar à obstrução de vasos distantes. Ambos mecanismos podem causar o AVCI (Rothwell, 2007).

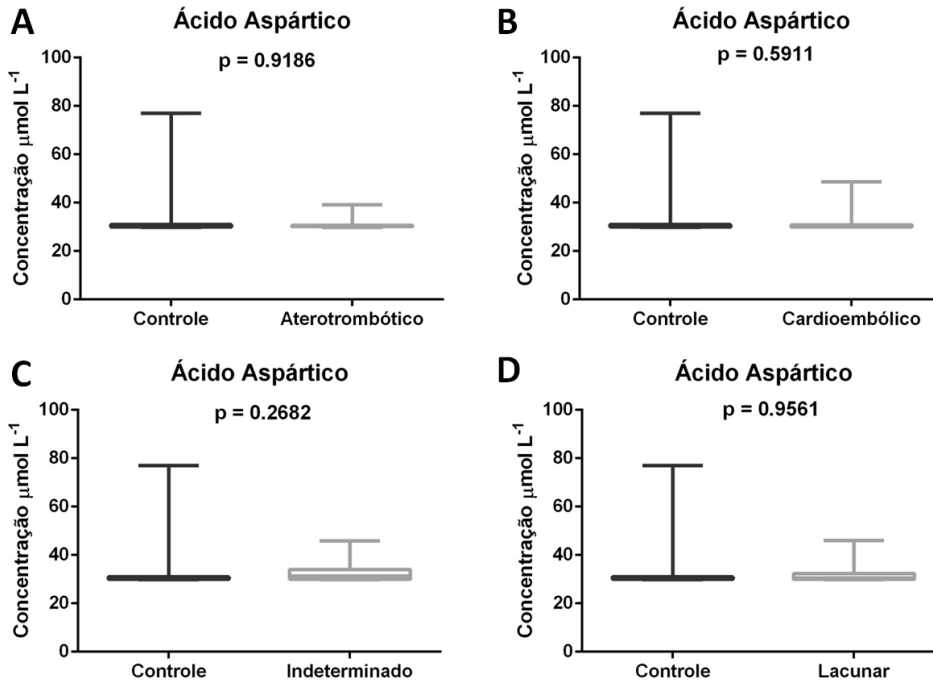
Um estudo desenvolvido por Erecinska et al. (1984), demonstrou que os níveis dos aminoácidos leucina, lisina, tirosina, valina e fenilalanina encontraram-se aumentados durante o período de isquemia induzida em ratos, permanecendo altos até duas horas após o evento e com diminuição lenta, chegando a níveis semelhantes aos dos controles apenas após 10h do início da isquemia. Esses resultados sugerem que durante a fase crônica do AVCI em ratos, alguns aminoácidos podem permanecer com valores de concentração semelhantes à fase aguda. Outros estudos também sugerem que alguns potenciais biomarcadores proteicos, tais como enzimas, podem ter valores de concentração alterados durante a fase aguda e permanecerem alterados ao longo da fase crônica do AVCI (Jickling and Sharp, 2011).

Tabela 3. Concentração de aminoácidos ($\mu\text{mol/L}$) encontrados em amostras de AVCI através da técnica de GC-MS.

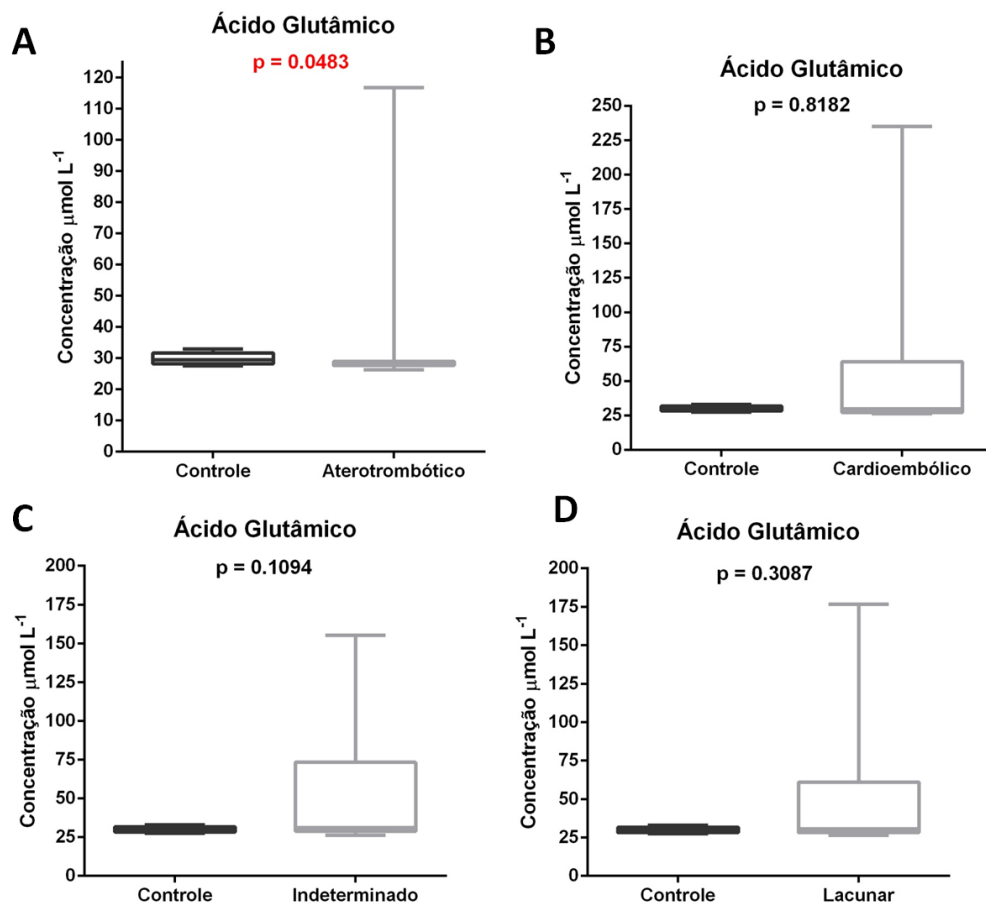
Subtipos de AVCI	Ala*	Gli*	Sar*	Val*	Leu*	Ile*	Ser*	Tre*	Asp*	Met*	Pro*	Cis*	Glu*	Fen*	Asn*	Lis*
Aterotrombótico	70,11 $\pm 41,79$	31,01 $\pm 23,02$	17,47 $\pm 3,97$	32,14 $\pm 16,62$	22,09 $\pm 7,14$	11,27 $\pm 2,17$	20,11 $\pm 0,90$	13,00 $\pm 2,16$	30,81 $\pm 1,99$	19,82 $\pm 0,10$	337,02 $\pm 477,69$	54764,49 $\pm 3347,80$	33,21 $\pm 19,85$	20,19 $\pm 3,80$	2,18 $\pm 1,60$	30,99 $\pm 0,46$
Cardioembólico	104,08 $\pm 129,69$	49,57 $\pm 51,21$	49,47 $\pm 135,44$	48,50 $\pm 58,61$	22,97 $\pm 17,80$	17,11 $\pm 13,99$	21,93 $\pm 5,56$	14,67 $\pm 7,18$	31,83 $\pm 4,52$	19,89 $\pm 0,17$	545,45 $\pm 706,12$	9451,56 $\pm 11309,22$	58,22 $\pm 58,40$	14,64 $\pm 9,30$	3,82 $\pm 3,04$	32,33 $\pm 1,97$
Lacunar	80,07 $\pm 87,50$	34,90 $\pm 31,42$	41,02 $\pm 93,65$	37,10 $\pm 35,39$	18,90 $\pm 10,14$	12,46 $\pm 4,76$	20,44 $\pm 2,56$	12,50 $\pm 3,18$	32,09 $\pm 4,07$	19,88 $\pm 0,17$	662,61 $\pm 1034,40$	8970,07 $\pm 9194,51$	47,42 $\pm 35,95$	13,92 $\pm 7,40$	4,74 $\pm 3,35$	31,68 $\pm 0,96$
Indeterminado	131,30 $\pm 117,83$	72,76 $\pm 73,91$	51,36 $\pm 91,01$	55,30 $\pm 54,90$	25,20 $\pm 18,37$	18,04 $\pm 13,91$	25,01 $\pm 11,94$	18,71 $\pm 15,24$	33,18 $\pm 4,66$	19,87 $\pm 0,16$	865,75 $\pm 1006,74$	6638,76 $\pm 6279,93$	51,49 $\pm 36,67$	16,35 $\pm 10,31$	4,64 $\pm 3,15$	32,14 $\pm 1,27$
Controle	146,24 $\pm 100,31$	22,91 $\pm 3,81$	33,68 $\pm 66,14$	31,48 $\pm 12,05$	13,22 $\pm 1,88$	10,21 $\pm 0,09$	20,80 $\pm 2,81$	12,76 $\pm 3,78$	34,31 $\pm 12,12$	20,02 $\pm 0,20$	90,12 $\pm 110,46$	12599,89 $\pm 12732,58$	29,90 $\pm 1,78$	9,32 $\pm 0,22$	5,66 $\pm 7,98$	31,50 $\pm 0,76$

* Média das concentrações de aminoácidos e desvio padrão. Alanina (Ala); Glicina (Gli); Sarcosina (Sar); Valina (Val); Leucina (Leu); Isoleucina (Ile); Serina (Ser); Treonina (Tre); Ácido Aspártico (Asp); Metionina (Met); Prolina (Pro); Cisteína (Cis); Ácido Glutâmico (Glu); Fenilalanina (Fen); Asn (Asparagina) e Lisina (Lis).

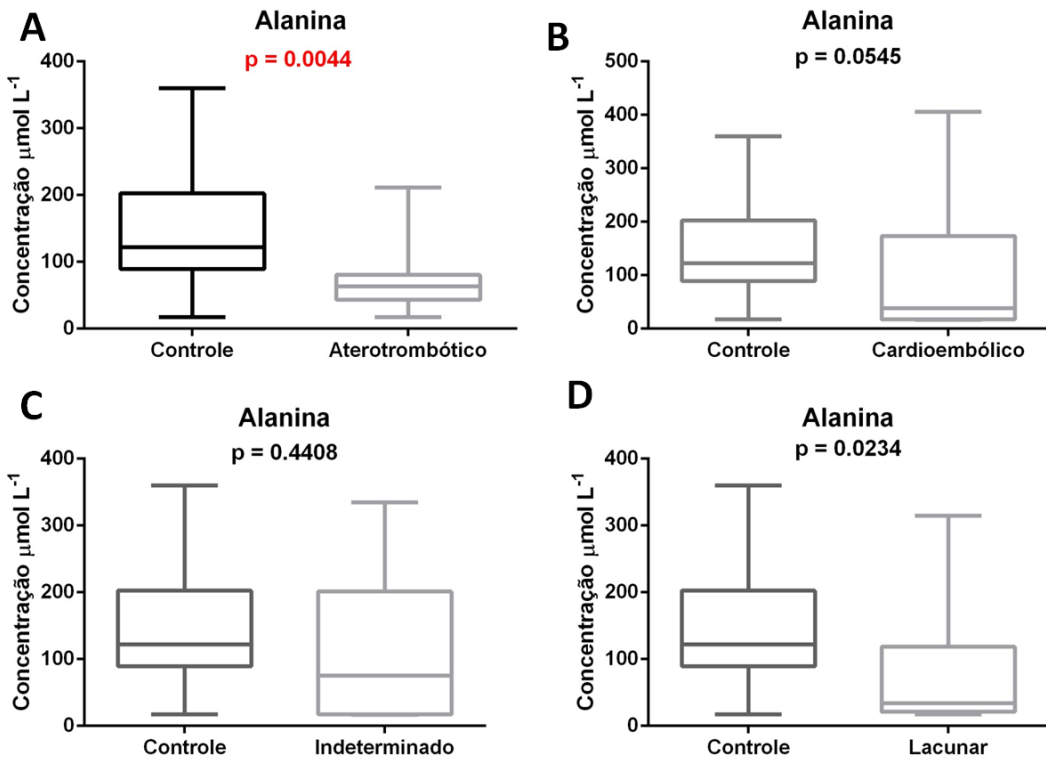
Box 1:



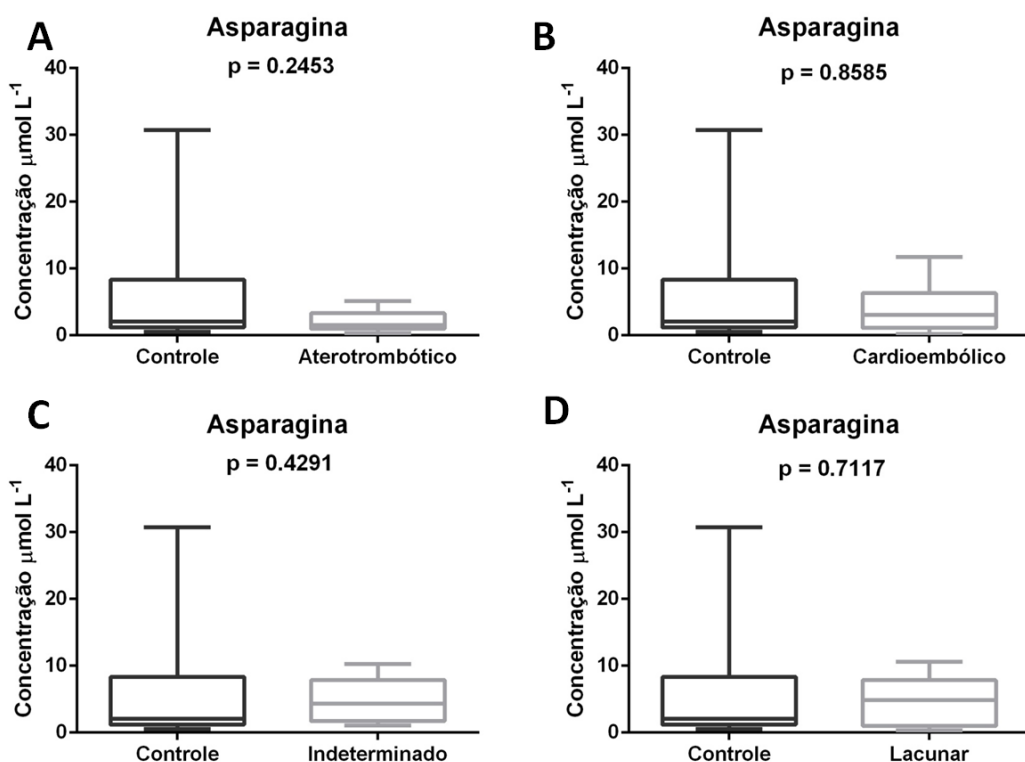
Box 2:



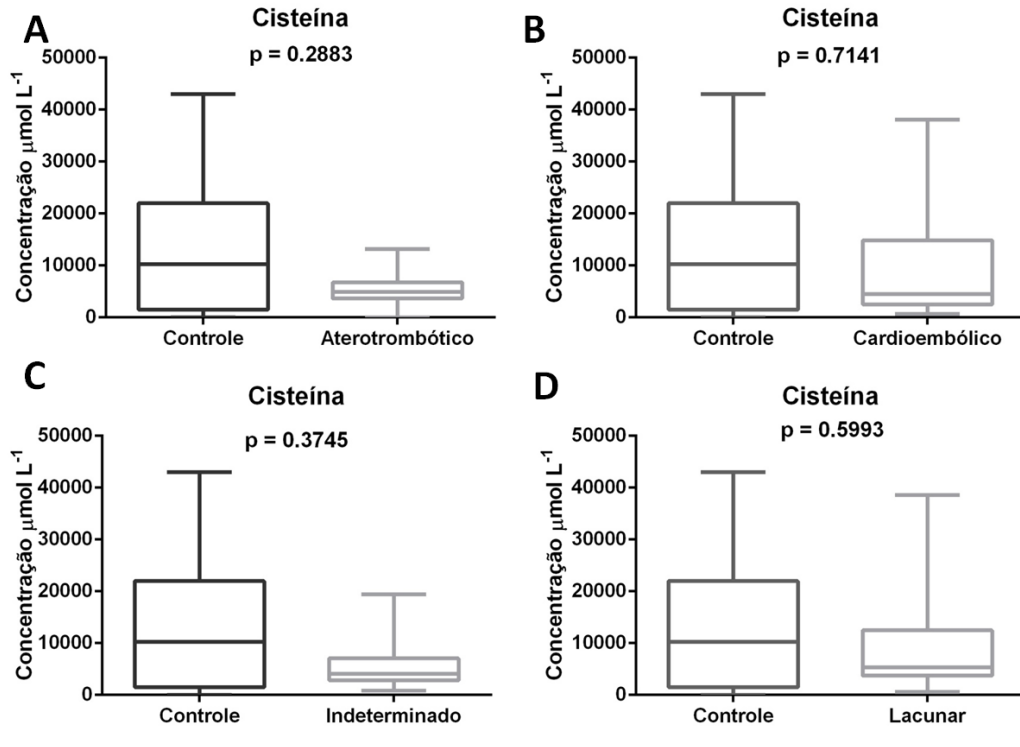
Box 3:



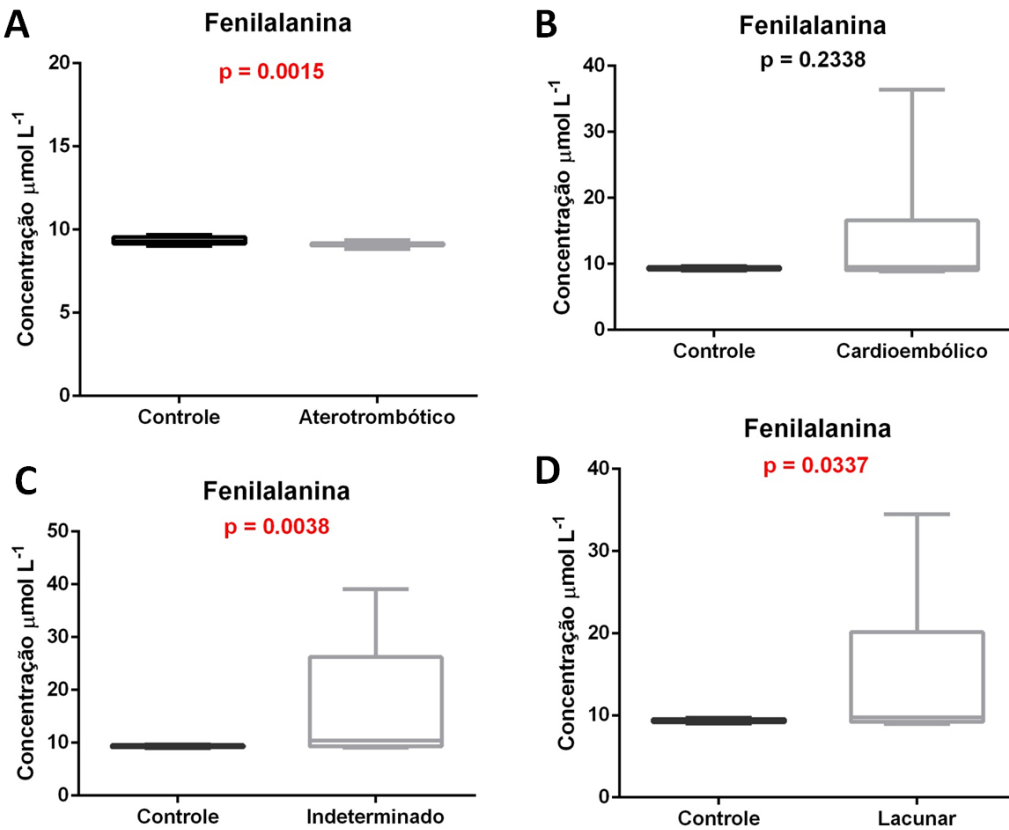
Box 4:



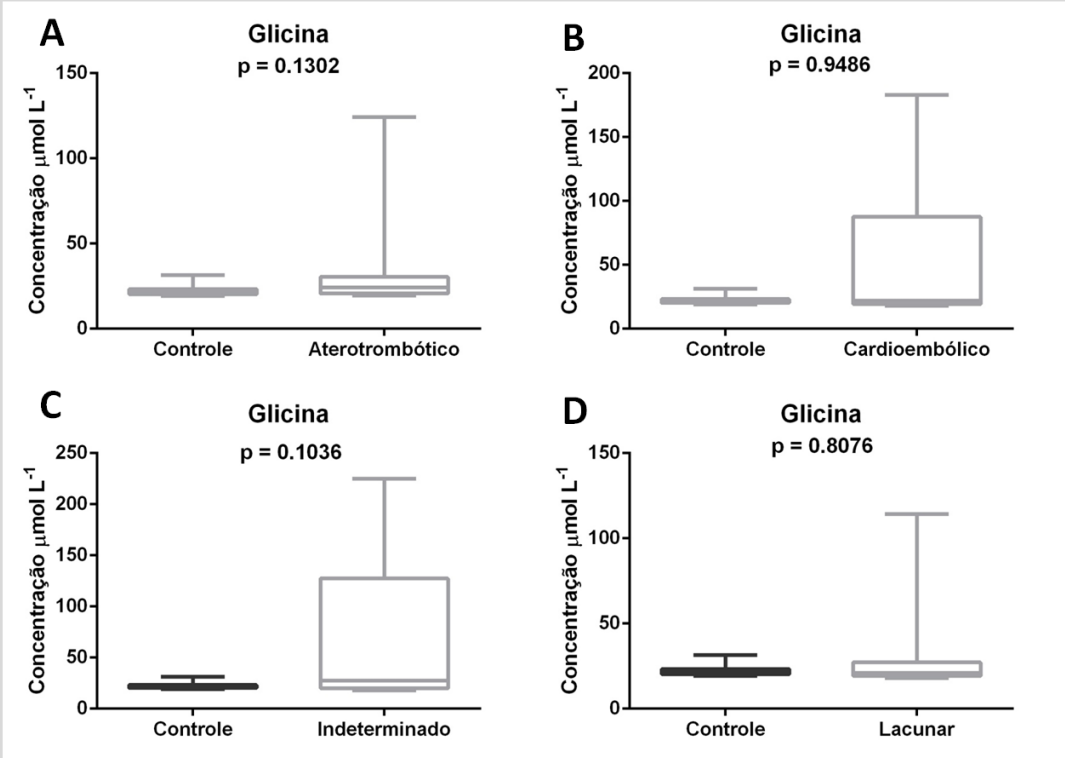
Box 5:



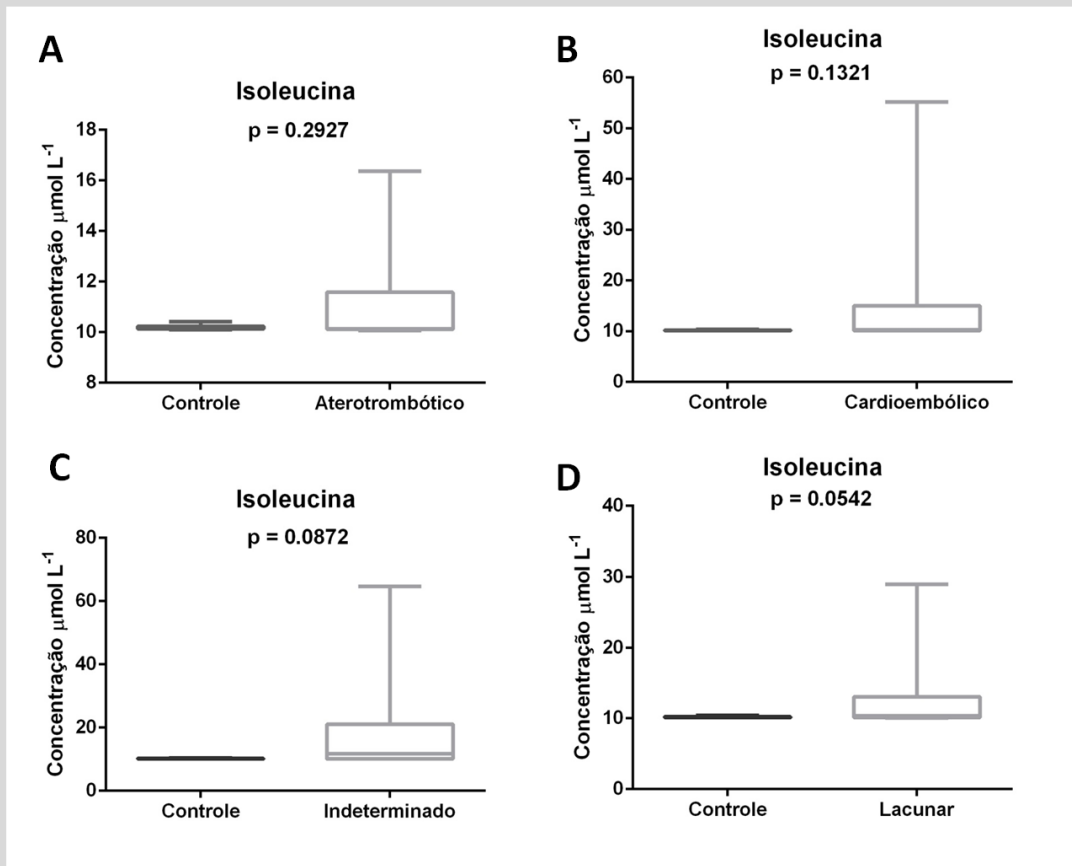
Box 6:



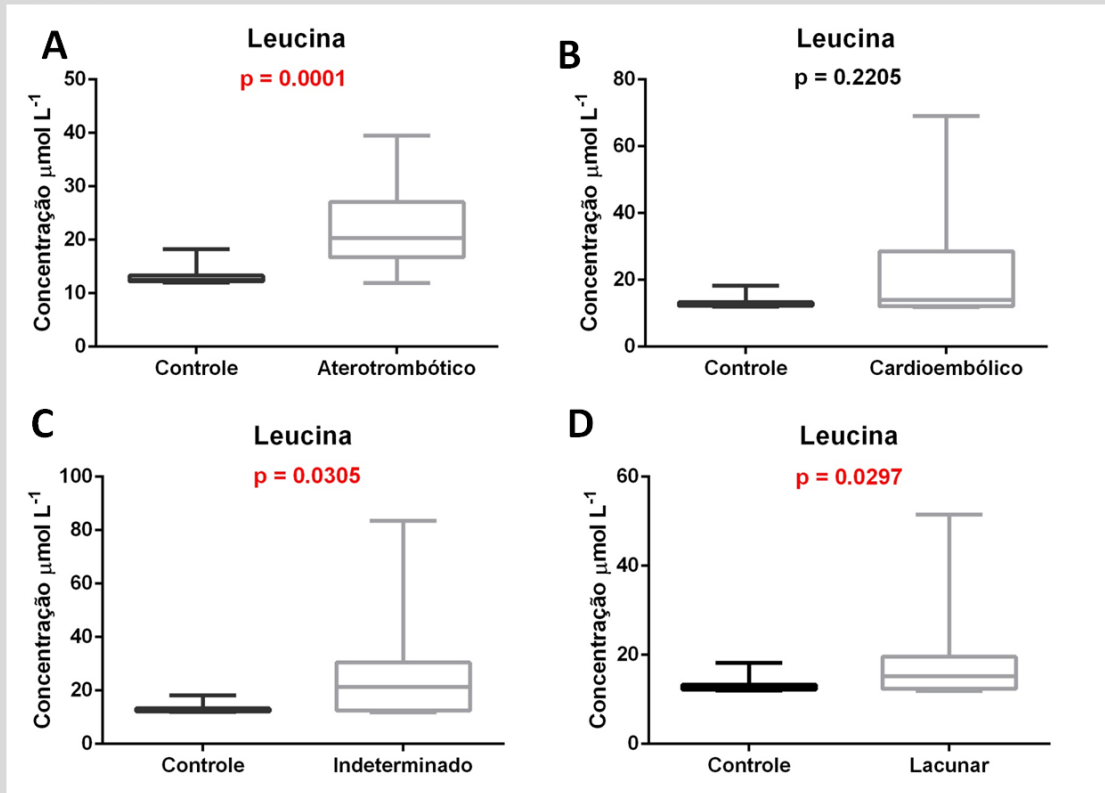
Box 7:



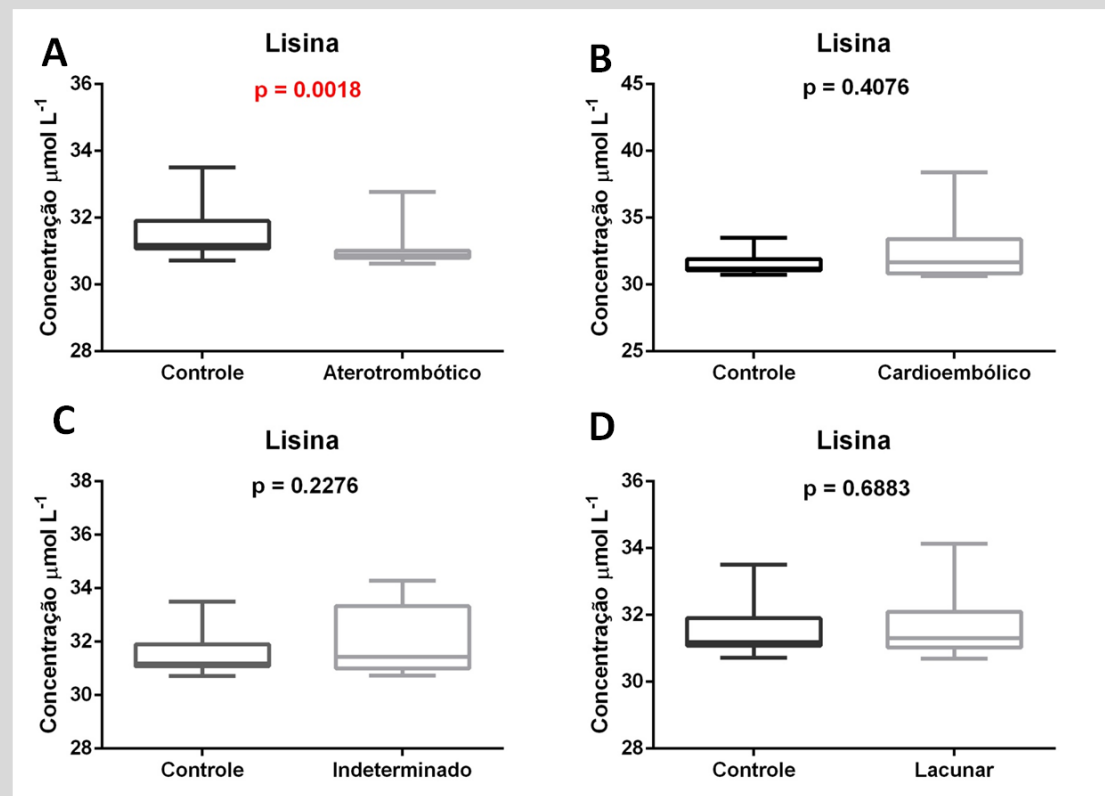
Box 8:



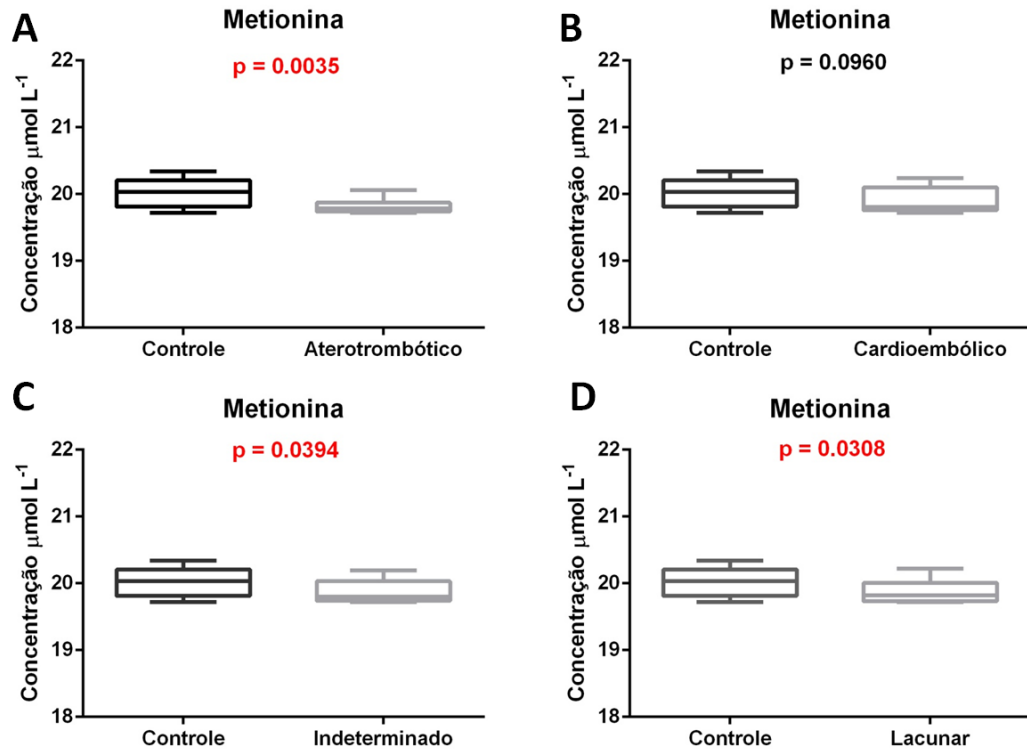
Box 9:



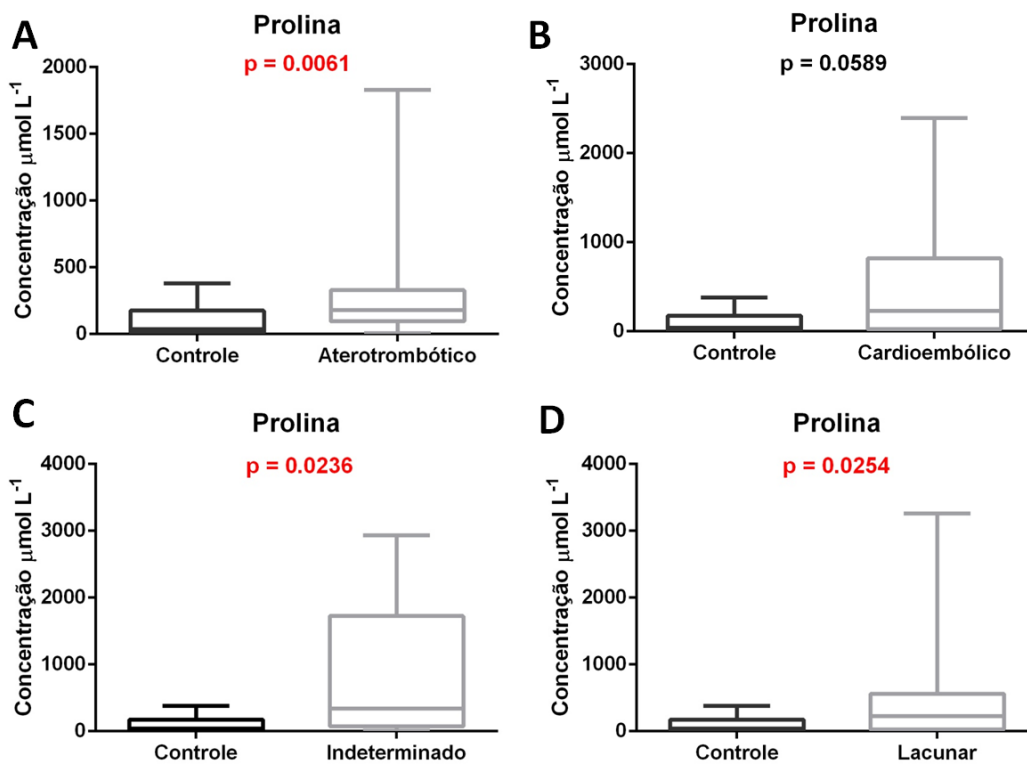
Box 10:



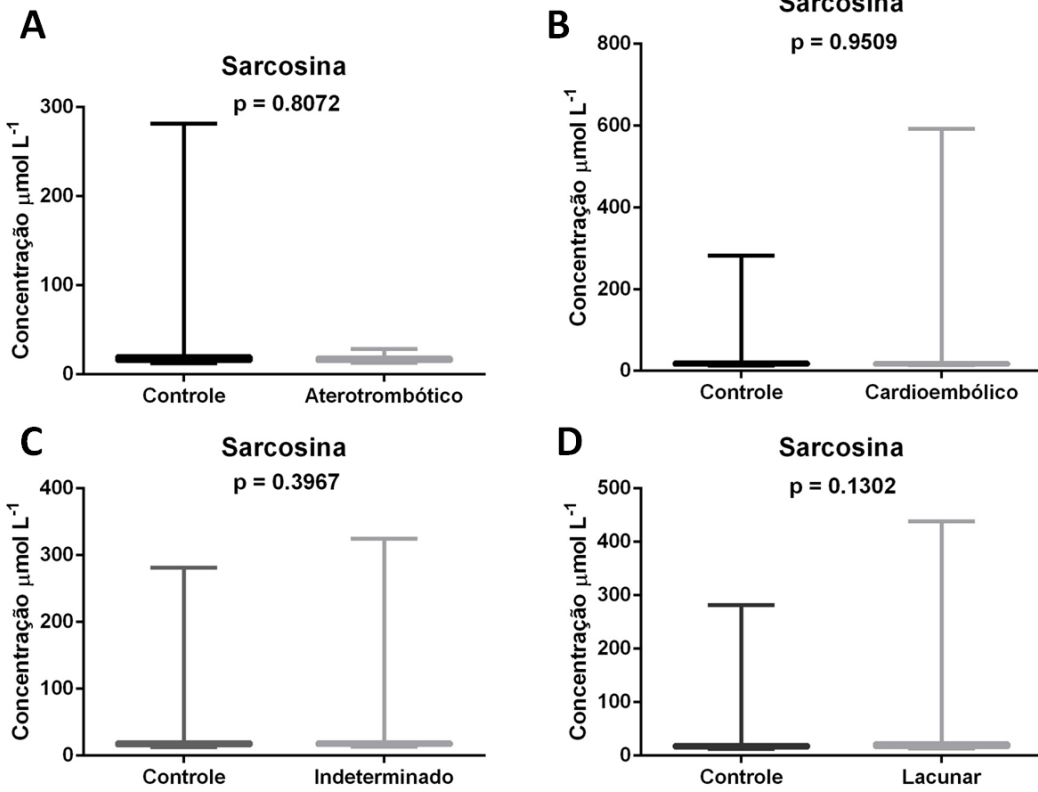
Box 11:



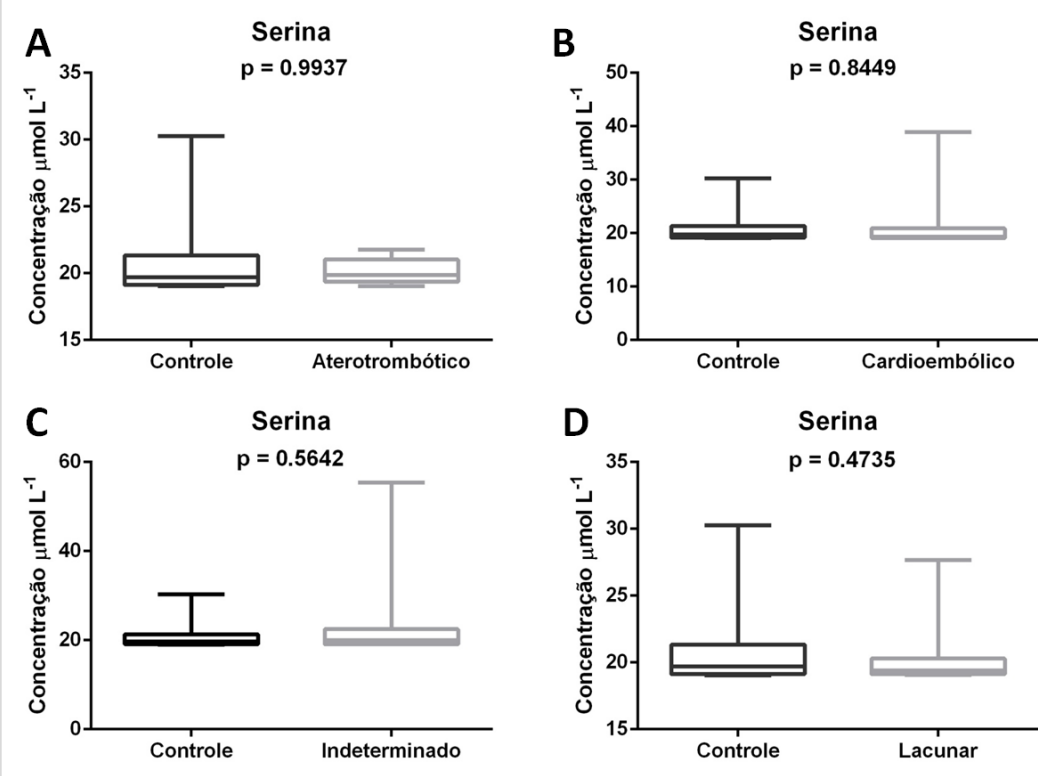
Box 12:



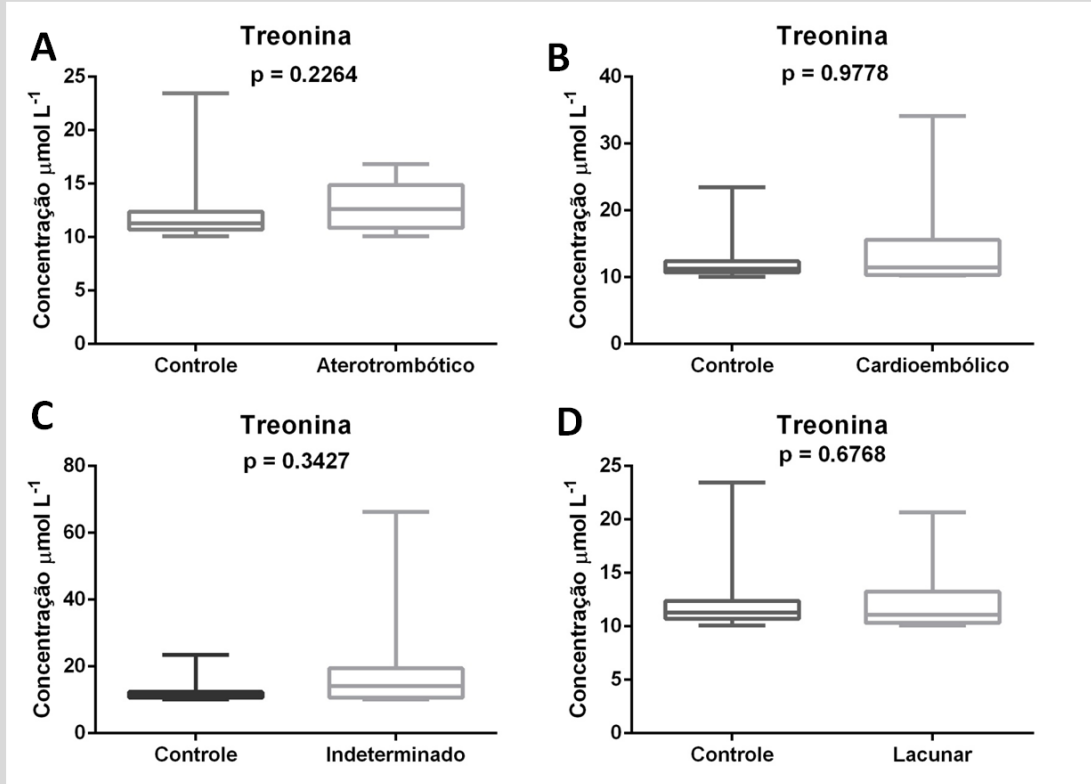
Box 13:



Box 14:



Box 15:



Box 16:

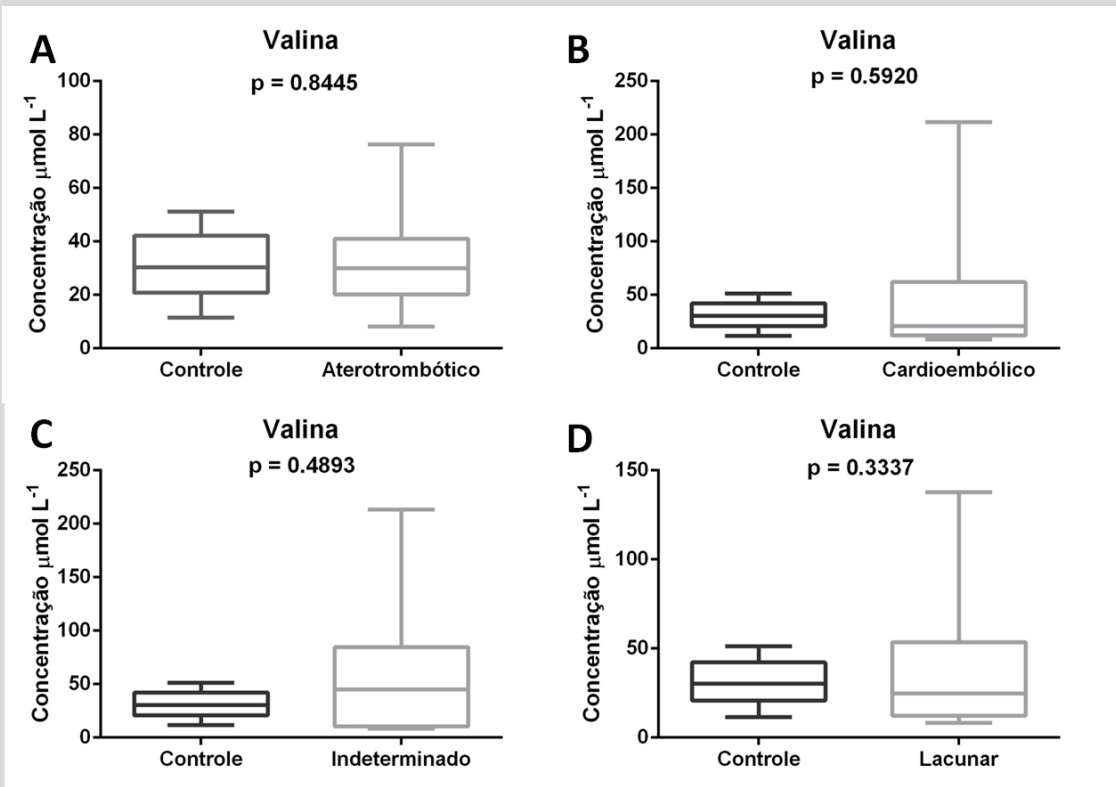


Figura 15. Boxes 1-16: representação gráfica da comparação dos níveis de aminoácidos presentes nas amostras de AVCI e grupo controle através do teste de *Mann-Whitney* (Teste U). Os cálculos foram feitos com base no valor das medianas encontradas para cada aminoácido. Foram considerados estatisticamente significantes as diferenças cujo $p < 0,05$ (em vermelho).

7.2 Identificação dos subtipos de AVCI e potenciais biomarcadores através de análise estatística multivariada

Nas últimas décadas a comunidade científica têm se esforçado na busca de biomarcadores que facilitem o diagnóstico precoce do AVCI, a identificação dos seus subtipos, para prever a gravidade e a evolução da doença, além de identificar os pacientes que podem se beneficiar de terapias específicas. As técnicas de imagem, principalmente as técnicas de imagem por ressonância magnética, ainda prevalecem como os melhores métodos de diagnóstico e acompanhamento para a doença, embora não sejam amplamente acessíveis. E ainda que estas técnicas apresentem um alto desempenho para o diagnóstico e prognóstico, cerca de 20-40% dos casos de AVCI permanecem com etiologia indeterminada (Saposnik, 2012). Isto implica em danos para o paciente, que muitas vezes tem seu quadro clínico agravado por não receber o tratamento adequado.

Um dos objetivos deste estudo foi investigar o potencial de um painel de 16 aminoácidos, de acordo com suas concentrações no plasma, em diferenciar os subtipos de AVCI crônico. Outro objetivo foi identificar dentre esses aminoácidos, quais poderiam caracterizar um determinado subtipo. Para tanto, utilizamos dois potentes métodos para a predição e separação de classes, o PLS-DA e o SVM-DA, com seleção de variáveis (OPS) e sem seleção de variáveis (FULL).

Foram construídos modelos para cada subtipo de AVCI *versus* o grupo controle, para cada subtipo *versus* os demais subtipos, e para o grupo controle *versus* todos os subtipos de AVCI. Os parâmetros estatísticos obtidos para cada modelo construído juntamente com os erros e acertos de predição estão apresentados nas **tabelas 4-8**. Os modelos que apresentaram maior grau de separação, considerando os parâmetros de menor RMSECV e menor erro de classe foram representados graficamente (**Fig. 16-20**). Todos os modelos foram construídos usando no máximo quatro variáveis latentes e a variável com maior poder de explicação da

covariância entre nossa matriz de dados X e a matriz resposta Y, foi plotada nos gráficos (eixo Y).

De modo geral, observamos que para nossa matriz de dados de concentração de aminoácidos em plasma, os modelos construídos por PLS-DA-OPS e SVM-DA-OPS foram os que apresentaram melhor desempenho de classificação e predição. Neste contexto, fica claro que o processo de seleção de variáveis confere uma potência maior aos métodos. Em nossas análises não foi possível encontrar um modelo com total acerto para predição/classificação em nenhum dos casos. No entanto, obtivemos baixos índices de erros e alto grau de separação para a maioria dos modelos, como por exemplo, para as análises do subtipo aterotrombótico *versus* controles, apresentados na **figura 16 e tabela 4**.

Usando esta abordagem de análise multivariada, observamos que é possível classificar os subtipos de AVCI com base nas diferenças de concentrações de aminoácidos obtidas através de GC-MS e conseguimos extrair da nossa matriz de dados os aminoácidos mais representativos para essa classificação. Encontramos a presença de um perfil de aminoácidos capaz de diferenciar pacientes com AVCI (indiferente do subtipo) em relação ao controle (**Tabela 8**) semelhante ao encontrado neste estudo através dos testes de *Mann-Whitney*, discutido no tópico anterior. Associando os resultados das análises multivariadas com o perfil encontrado através dos testes de *Mann-Whitney*, podemos inferir uma assinatura metabólica para o AVCI formada pelos aminoácidos metionina, alanina, glicina, serina, leucina, prolina, fenilalanina, leucina e lisina. Cada subtipo de AVCI também apresenta um perfil característico de aminoácidos em relação ao controle e aos demais subtipos, que também podem ser considerados assinaturas metabólicas (**Tabelas 4-7**). Estes aminoácidos categorizados nestes perfis podem ser considerados biomarcadores em potencial para o AVCI crônico.

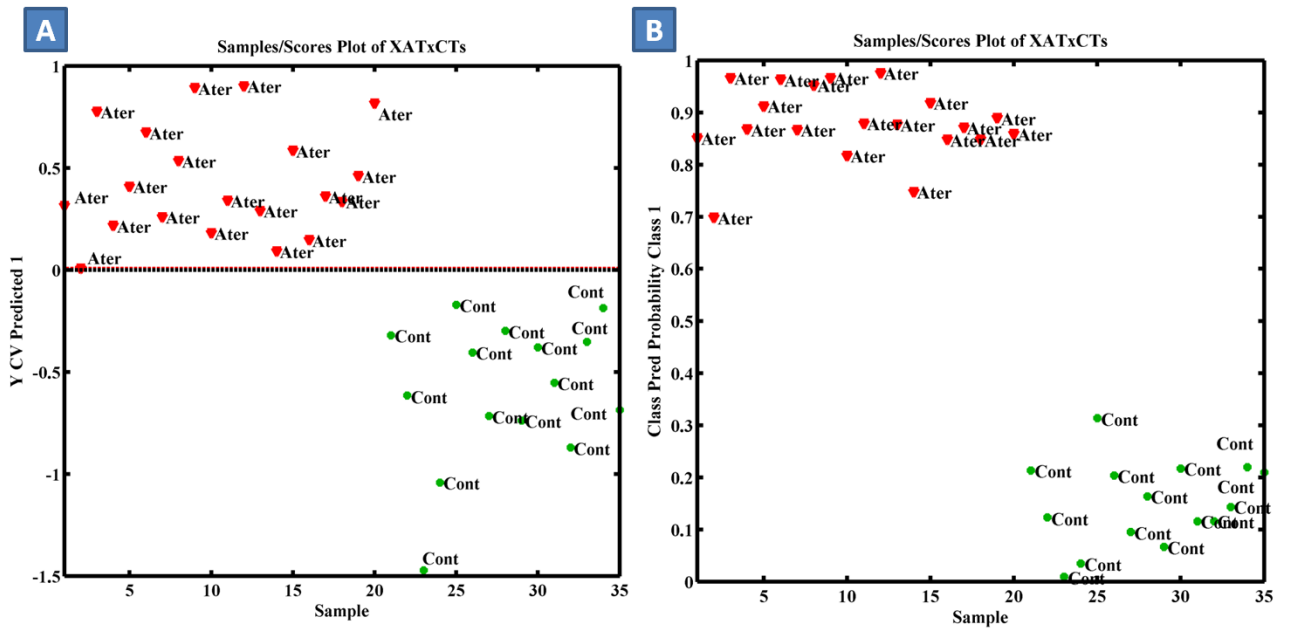


Figura 16. Representação gráfica da separação obtida entre amostras de AVCI do subtipo aterotrombótico *versus* controles, através dos modelos construídos por PLS-DA-OPS (A) e SVM-DA-OPS (B).

Tabela 4. Dados estatísticos dos modelos construídos para o subtipo de AVCI aterotrombótico (ATERO) *versus* controles (CONT) e aterotrombótico *versus* os demais subtipos (SUBT). As variáveis (aminoácidos) que apresentaram maior contribuição para a separação das classes estão listadas na última coluna da tabela, na ordem do seu nível de importância. Os modelos plotados em gráficos estão marcados em vermelho na tabela e apresentados na figura 16.

	PLS-DA-FULL		PLS-DA-OPS		SVM-DA-FULL		SVM-DA-OPS		Variáveis selecionadas
	ATEROxCONT (n=20) (n=15)		ATEROxCONT (n=20) (n=15)		ATEROxCONT (n=20) (n=15)		ATEROxCONT (n=20) (n=15)		ATEROxCONT (n=20) (n=15)
Predito corretamente	19	14	20	15	19	13	20	14	1-Ala
Predito incorretamente	1	1	0	0	1	2	0	1	2-Cys
RMSECV	0.68-0.66		0.64-0.51		0		0.028		3-Leu
Erro de classe	0.058-0.058		0-0		0.09		0.03		4-Asn
	ATEROxSUBT (n=20) (n=53)		ATEROxSUBT (n=20) (n=53)		ATEROxSUBT (n=20) (n=53)		ATEROxSUBT (n=20) (n=53)		ATEROxSUBT (n=20) (n=53)
Predito corretamente	17	29	17	40	11	50	9	47	5-Lis
Predito incorretamente	3	24	3	13	9	3	11	6	6-Phe
RMSECV	0.49-0.84		0.48-0.83		0.13		0.17		7-Ile
Erro de classe	0.03-0.03		0.23-0.23		0.25		0.33		8-Met
									9-Gly
									10-Lis

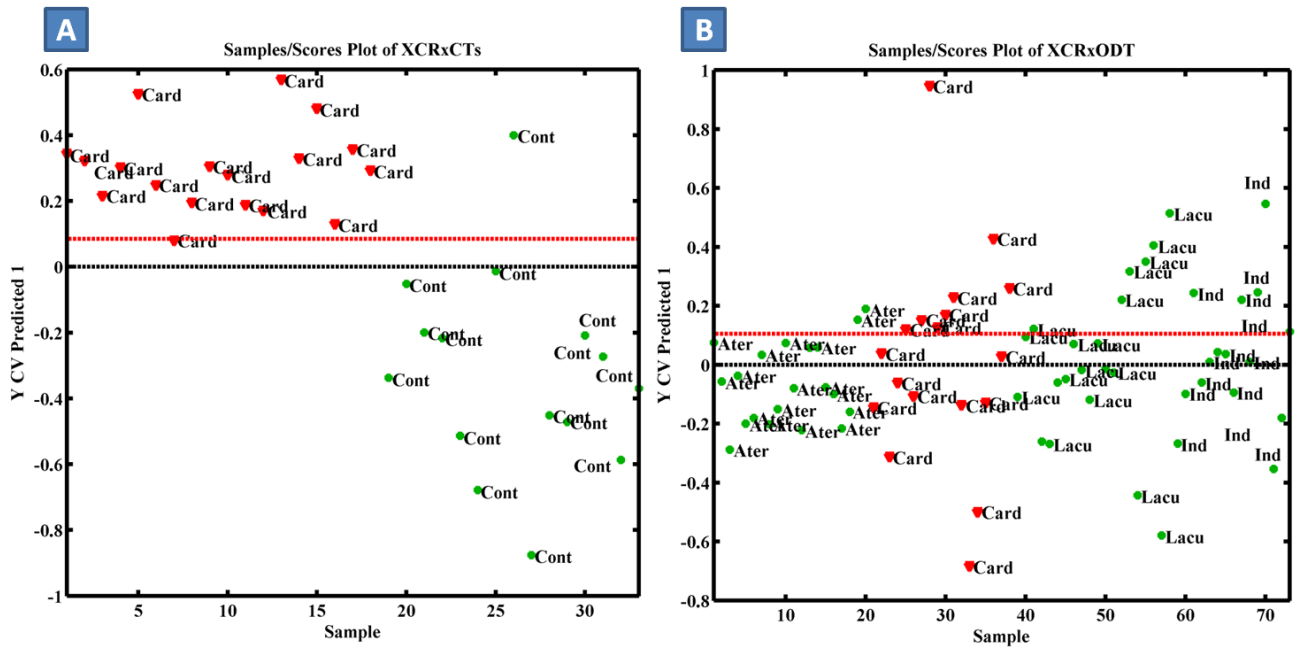


Figura 17. Representação gráfica da separação obtida entre amostras de AVCI do subtipo cardioembólico *versus* controles e cardioembólico *versus* os demais subtipos através dos modelos construídos por PLS-DA-OPS (A e B).

Tabela 5. Dados estatísticos dos modelos construídos para o subtipo de AVCI cardioembólico (CARD) *versus* controles (CONT) e cardioembólico *versus* os demais subtipos (SUBT). As variáveis (aminoácidos) que apresentaram maior contribuição para a separação das classes estão listadas na última coluna da tabela, na ordem do seu nível de importância. Os modelos plotados em gráficos estão marcados em vermelho na tabela e apresentados na figura 17.

	PLS-DA-FULL		PLS-DA-OPS		SVM-DA-FULL		SVM-DA-OPS		Variáveis selecionadas
	CARDxCONT (n=18)	CONT (n=15)	CARDxCONT (n=18)	CONT (n=15)	CARDxCONT (n=18)	CONT (n=15)	CARDxCONT (n=18)	CONT (n=15)	CARDxCONT (n=18)(n=15)
Predito corretamente	18	13	17	14	18	12	16	12	1-Leu
Predito incorretamente	0	2	1	1	0	3	2	3	2-Gly
RMSECV	0.66-0.56		0.60-0.55		0.07-0.07		0.06-0.06		3-Ala
Erro de classe	0.06-0.06		0.03-0.03		0.1		0.16		4- Val
	CARDxSUBT (n=18) (n=55)		CARDxSUBT (n=18) (n=55)		CARDxSUBT (n=18) (n=55)		CARDxSUBT (n=18) (n=55)		CARDxSUBT (n=18)(n=55)
Predito corretamente	10	41	5	43	3	1	3	1	1-Glu
Predito incorretamente	8	14	13	12	15	51	15	54	2-Phe
RMSECV	0.54-0.89		0.50-0.87		0.22		0.22		3- Asp
Erro de classe	0.39-0.39		0.44-0.44		0.42		0.45		4-Gly
									5-Lis
									6-Pro

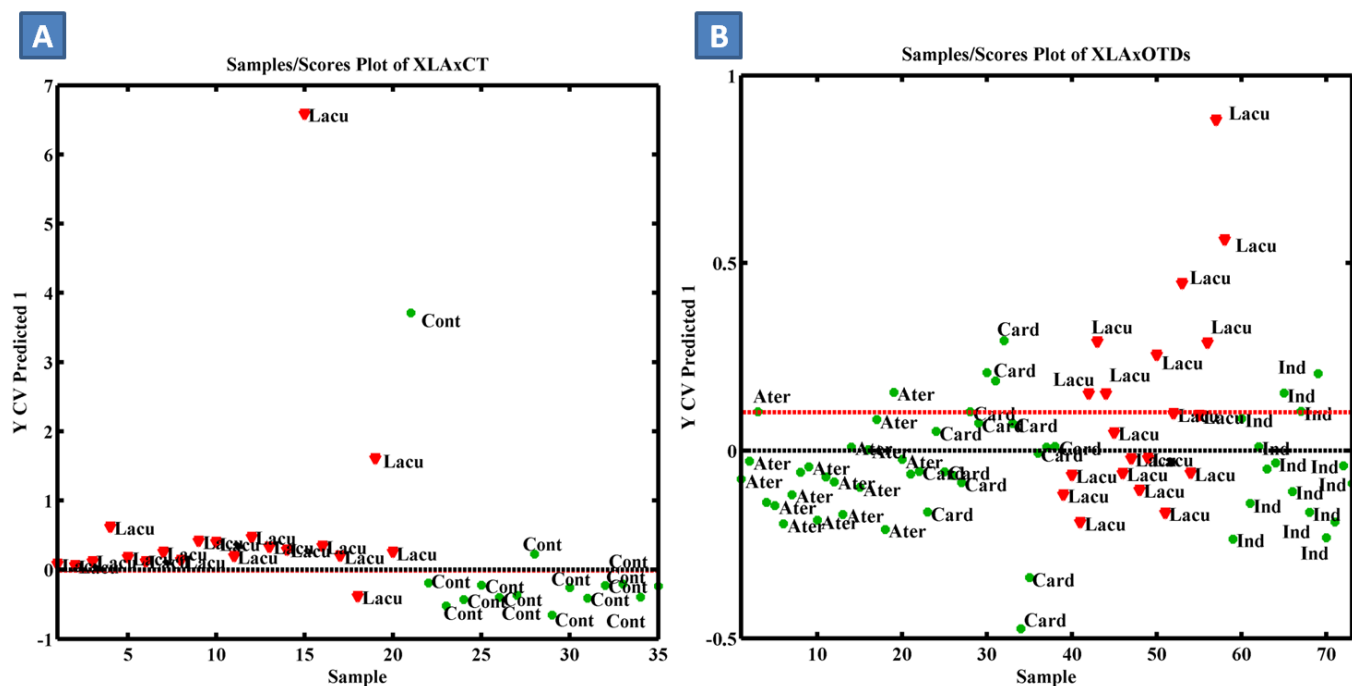


Figura 18. Representação gráfica da separação obtida entre amostras de AVCI do subtipo lacunar *versus* controles e lacunar *versus* os demais subtipos, através dos modelos construídos por PLS-DA-OPS (A) e PLS-DA-FULL(B).

Tabela 6. Dados estatísticos dos modelos construídos para o subtipo de AVCI lacunar (LAC) *versus* controles (CONT) e lacunar *versus* os demais subtipos (SUBT). As variáveis (aminoácidos) que apresentaram maior contribuição para a separação das classes estão listadas na última coluna da tabela, na ordem do seu nível de importância. Os modelos plotados em gráficos estão marcados em vermelho na tabela e apresentados na figura 18.

	PLS-DA-FULL		PLS-DA-OPS		SVM-DA-FULL		SVM-DA-OPS		Variáveis selecionadas
	LACxCONT (n=20) (n=15)		LACxCONT (n=20) (n=15)		LACxCONT (n=20) (n=15)		LACxCONT (n=20) (n=15)		LACxCONT (n=20)(n=15)
Predito corretamente	19	13	18	13	19	11	17	14	1-Val
Predito incorretamente	1	2	2	2	1	4	3	1	2-Leu
RMSECV	1.29 -1.48		0.60-0.66		0.16		0.06		3-Ala
Erro de classe	0.09-0.09		0.12-0.12		0.10		0.10		4-Gly
	LACxSUBT (n=20) (n=53)		LACxSUBT (n=20) (n=53)		LACxSUBT (n=20) (n=53)		LACxSUBT (n=20) (n=53)		LACxSUBT (n=20)(n=53)
Predito corretamente	5	37	8	43	2	45	7	43	5-Phe
Predito incorretamente	15	16	12	10	18	2	13	43	6-Cys
RMSECV	0.54-0.84		0.49-0.83		0.28		0.26		1-Gly
Erro de classe	0.49-0.49		0.35-0.35		0.52		0.42		2-Ser
									3-Phe
									4-The
									5-Asn
									6-Ile

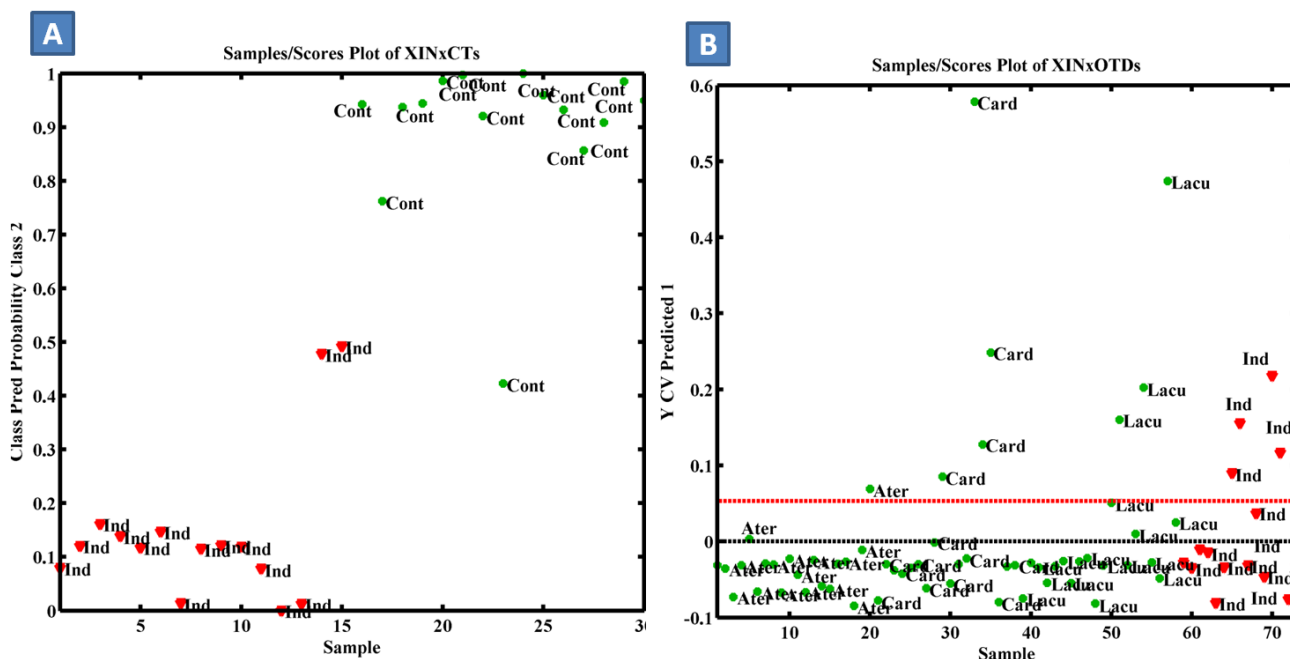


Figura 19. Representação gráfica da separação obtida entre amostras de AVCI do subtipo indeterminado *versus* controles (A) por SVM-DA-OPS, e indeterminado *versus* os demais subtipos por PLS-DA-FULL (B).

Tabela 7. Dados estatísticos dos modelos construídos para o subtipo de AVCI indeterminado (IND) *versus* controles (CONT) e indeterminado *versus* os demais subtipos (SUBT). As variáveis (aminoácidos) que apresentaram maior contribuição para a separação das classes estão listadas na última coluna da tabela, na ordem do seu nível de importância. Os modelos plotados em gráficos estão marcados em vermelho na tabela e apresentados na figura 19.

	PLS-DA-FULL		PLS-DA-OPS		SVM-DA-FULL		SVM-DA-OPS		Variáveis selecionadas
	INDxCONT (n=15) (n=15)		INDxCONT (n=15) (n=15)		INDxCONT (n=15) (n=15)		INDxCONT (n=15) (n=15)		INDxCONT (n=15)(n=15)
Predito corretamente	14	13	14	14	14	14	15	14	1-Gly
Predito incorretamente	1	2	1	1	1	1	0	1	2- Leu
RMSECV	0.65-0.69		0.57-0.61		0.03		0.03		3-Val
Erro de classe	0.1-0.1		0.07-0.07		0.07		0.03		4-Ser
	INDxSUBT (n=15) (n=58)		INDxSUBT (n=15) (n=58)		INDxSUBT (n=15) (n=58)		INDxSUBT (n=15) (n=58)		INDxSUBT (n=15)(n=58)
Predito corretamente	4	51	4	50	1	57	2	55	1-Glu
Predito incorretamente	11	7	11	8	14	1	13	3	2-Asp
RMSECV	0.45-0.89		0.46-0.90		0.19		0.16		3-Ile
Erro de classe	0.42-0.42		0.44-0.44		0.47		0.46		4- Met
									5- Phe
									6- Pro

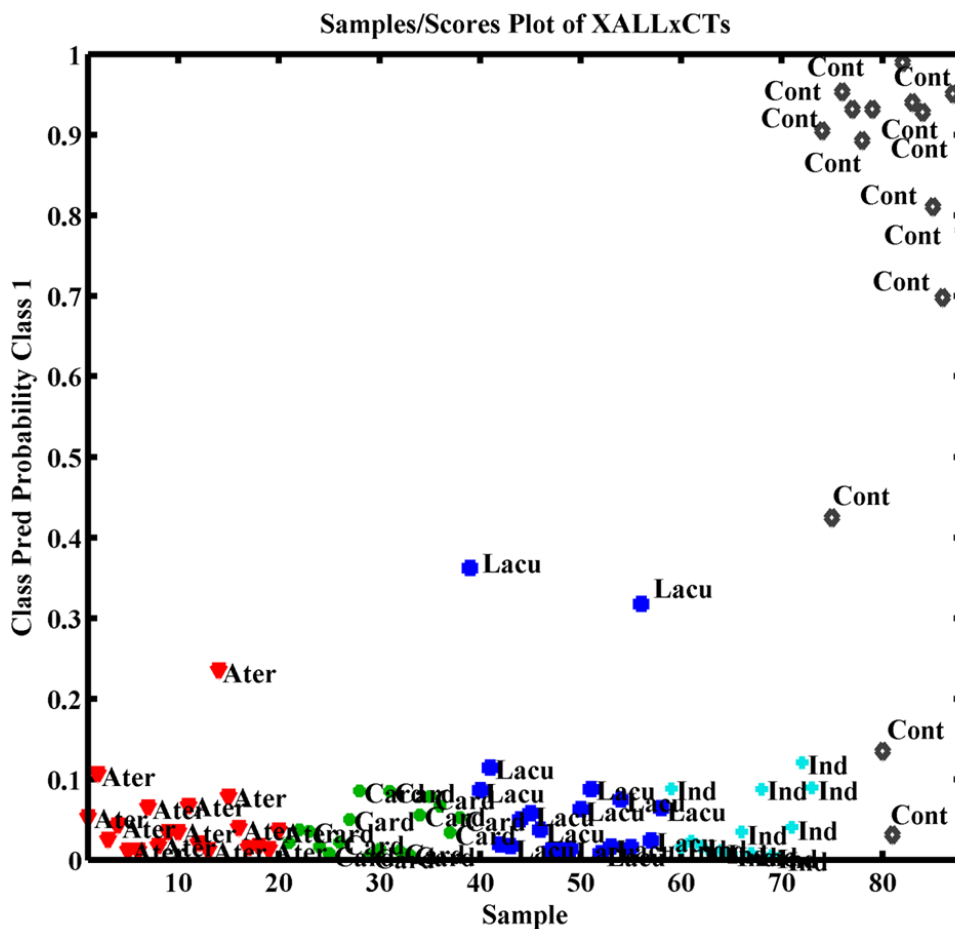


Figura 20. Representação gráfica da separação obtida entre amostras controles versus todos os subtipos de AVCI por SVM-DA-OPS.

Tabela 8. Dados estatísticos dos modelos construídos para as amostras controles (CONT) *versus* os demais subtipos de AVCI (SUBT). As variáveis (aminoácidos) que apresentaram maior contribuição para a separação das classes estão listadas na última coluna da tabela, na ordem do seu nível de importância. O modelo plotado em gráfico está marcado em vermelho na tabela e apresentado na figura 20.

	PLS-DA-FULL		PLS-DA-OPS		SVM-DA-FULL		SVM-DA-OPS		Variáveis selecionadas
	CONTxSUBT (n=15)	CONTxSUBT (n=73)	CONTxSUBT (n=15)	CONTxSUBT (n=73)	CONTxSUBT (n=15)	CONTxSUBT (n=73)	CONTxSUBT (n=15)	CONTxSUBT (n=73)	
Predito corretamente	14	65	14	66	10	73	12	70	1-Met
Predito incorretamente	1	8	1	7	5	0	3	3	2-Ala
RMSECV	0.3-0.87		0.29-0.87		0.03		0.034		3-Gly
Erro de classe	0.08-0.08		0.08-0.08		0.16		0.12		4-Ser
									5-Leu
									6-Pro

8 CONCLUSÃO

Considerando que o AVCI é a terceira principal causa de morte no mundo e a principal causa de incapacidade neurológica em adultos (Go et al., 2013) e que até a presente data, não existem biomarcadores moleculares para o diagnóstico e prognóstico da doença que possam ser utilizados na prática clínica (Saenger and Christenson, 2010), este trabalho representa um avanço nas pesquisas que visam encontrar biomarcadores para o AVCI.

Através da técnica de GC-MS, conseguimos obter as concentrações de 16 aminoácidos no plasma de pacientes com AVCI dos subtipos aterotrombótico, lacunar, cardioembólico e indeterminado, além do grupo controle. Verificamos que pacientes com AVCI crônico possuem perfis de concentração de aminoácidos no plasma diferentes de indivíduos que nunca tiveram AVCI. A análise destes dados de concentração permitiram-nos alcançar os objetivos propostos no estudo que, basicamente, consistiam em caracterizar os perfis de aminoácidos e identificar potenciais biomarcadores para o AVCI crônico.

O uso de GC-MS associada à métodos potentes de análise estatística multivariada (PLS-DA e SVM), nos permitiu encontrar separação entre os subtipos de AVCI, sendo que cada subtipo apresenta um conjunto de aminoácidos mais representativos, o que pode ser entendido como uma assinatura ou um perfil metabólico característico. Encontramos ainda, um perfil de aminoácidos que permitem diferenciar amostras de pacientes com AVCI crônico, independente do subtipo, de indivíduos controle. Os aminoácidos encontrados que compõem esta assinatura metabólica para o AVCI crônico são: metionina, alanina, glicina, serina, leucina, prolina, fenilalanina, leucina e lisina. Novos estudos usando amostras de pacientes com AVCI agudo são necessários para comprovar se essas assinaturas metabólicas também estão presentes na fase aguda da doença, de modo que possam contribuir como biomarcadores não apenas para o prognóstico da doença, mas também para o diagnóstico.

Por fim, dentre várias razões destacamos o ineditismo deste trabalho: (1) não há relatos de estudos metabólicos sobre o AVCI crônico que tenham empregado a técnica de GC-MS associada com os métodos de análises multivariadas utilizadas neste estudo; (2) o método utilizado para a análise das amostras por GC-MS foi recentemente desenvolvido e padronizado, sendo adaptado neste estudo para ser utilizado pela primeira vez em amostras de plasma; (3) a maioria dos trabalhos sobre AVCI disponíveis, principalmente no que se refere a

identificação e quantificação de aminoácidos, têm sido realizados em modelo murino; e (4) no Brasil, o AVCI é considerado uma doença negligenciada, de modo que este estudo é o primeiro a pesquisar por metabólitos (aminoácidos) como potenciais biomarcadores da doença na população brasileira.

PERSPECTIVAS FUTURAS

- Isolar os RNAs presentes no plasma de pacientes com AVCI crônico e submetê-los à RT-PCR. Em seguida, investigar a expressão de genes que codificam enzimas relacionadas ao metabolismo de aminoácidos;
- Analisar a expressão gênica de células de linhagem endotelial humana tratadas com plasma de pacientes com AVCI crônico;
- Analisar outros grupos de amostras através da técnica de GC-MS, principalmente amostras de pacientes com AVCI agudo e com outras doenças neurodegenerativas;
- Validar novos métodos para a identificação e quantificação de outros metabólitos, tais como, ácidos graxos e carboidratos através da técnica de GC-MS;
- Criar sondas químicas para a detecção e quantificação de aminoácidos no plasma sanguíneo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A J, Trygg J, Gullberg J, Johansson AI, Jonsson P, Antti H, Marklund SL, Moritz T (2005) Extraction and GC/MS analysis of the human blood plasma metabolome. *Analytical chemistry* 77:8086-8094.
- Adams HP, del Zoppo G, Alberts MJ, Bhatt DL, Brass L, Furlan A, Grubb RL, Higashida RT, Jauch EC, Kidwell C, Lyden PD, Morgenstern LB, Qureshi AI, Rosenwasser RH, Scott PA, Wijdicks EFM (2007) Guidelines for the Early Management of Adults With Ischemic Stroke: A Guideline From the American Heart Association/ American Stroke Association Stroke Council, Clinical Cardiology Council, Cardiovascular Radiology and Intervention Council, and the Atherosclerotic Peripheral Vascular Disease and Quality of Care Outcomes in Research Interdisciplinary Working Groups: The American Academy of Neurology affirms the value of this guideline as an educational tool for neurologists. *Stroke* 38:1655-1711.
- Adams HP, Jr. (2009) Secondary prevention of atherothrombotic events after ischemic stroke. *Mayo Clinic proceedings Mayo Clinic* 84:43-51.
- Adams HP, Jr., Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, Marsh EE, 3rd (1993) Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke* 24:35-41.
- Akpan N, Troy CM (2013) Caspase inhibitors: prospective therapies for stroke. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* 19:129-136.
- Altieri M, Troisi P, Maestrini I, Lenzi GL (2009) Cryptogenic Stroke: Cryptic Definition? *Stroke* 40:e530.
- Amantea D, Nappi G, Bernardi G, Bagetta G, Corasaniti MT (2009) Post-ischemic brain damage: pathophysiology and role of inflammatory mediators. *The FEBS journal* 276:13-26.
- Arboix A, Alio J (2010) Cardioembolic stroke: clinical features, specific cardiac disorders and prognosis. *Current cardiology reviews* 6:150-161.
- Arboix A, Alio J (2012) Acute cardioembolic cerebral infarction: answers to clinical questions. *Current cardiology reviews* 8:54-67.
- Arboix A, Bechich S, Oliveres M, Garcia-Eroles L, Massons J, Targa C (2001) Ischemic stroke of unusual cause: clinical features, etiology and outcome. *European journal of neurology : the official journal of the European Federation of Neurological Societies* 8:133-139.
- Arboix A, Marti-Vilalta JL (2009) Lacunar stroke. *Expert review of neurotherapeutics* 9:179-196.
- Arsava EM (2012) The role of MRI as a prognostic tool in ischemic stroke. *Journal of neurochemistry* 2:22-28.
- Bang OY (2009) Multimodal MRI for Ischemic Stroke: From Acute Therapy to Preventive Strategies. *J Clin Neurol* 5:107-119.

- Begley P, Francis-McIntyre S, Dunn WB, Broadhurst DI, Halsall A, Tseng A, Knowles J, Goodacre R, Kell DB (2009) Development and performance of a gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry analysis for large-scale nontargeted metabolomic studies of human serum. *Analytical chemistry* 81:7038-7046.
- Benbir G, Uluduz D, Ince B, Bozluolcay M (2007) Atherothrombotic ischemic stroke in patients with atrial fibrillation. *Clinical Neurology and Neurosurgery* 109:485-490.
- Berg JM TJ, Stryer L (2002) Protein Turnover and Amino Acid Catabolism. In: *Biochemistry* (Freeman, W. H., ed) New York.
- Bolanos JP, Almeida A (1999) Roles of nitric oxide in brain hypoxia-ischemia. *Biochimica et biophysica acta* 1411:415-436.
- Boonmark NW, Lou XJ, Yang ZJ, Schwartz K, Zhang JL, Rubin EM, Lawn RM (1997) Modification of apolipoprotein(a) lysine binding site reduces atherosclerosis in transgenic mice. *The Journal of Clinical Investigation* 100:558-564.
- Brattstrom L, Lindgren A, Israelsson B, Malinow MR, Norrving B, Upson B, Hamfelt A (1992) Hyperhomocysteinaemia in stroke: prevalence, cause, and relationships to type of stroke and stroke risk factors. *European journal of clinical investigation* 22:214-221.
- Brosnan JT (2003) Interorgan Amino Acid Transport and its Regulation. *The Journal of nutrition* 133:2068S-2072S.
- Budzikiewicz H (2005) J.H. Gross: *Mass Spectrometry. A Textbook*. *Anal Bioanal Chem* 381:1319-1320.
- Burke E, Cramer SC (2013) Biomarkers and predictors of restorative therapy effects after stroke. *Current neurology and neuroscience reports* 13:329.
- Castillo J, Davalos A, Noya M (1997) Progression of ischaemic stroke and excitotoxic aminoacids. *Lancet* 349:79-83.
- Chan ECY, Pasikanti KK, Nicholson JK (2011) Global urinary metabolic profiling procedures using gas chromatography-mass spectrometry. *Nat Protocols* 6:1483-1499.
- Chen PH, Gao S, Wang YJ, Xu AD, Li YS, Wang D (2012) Classifying Ischemic Stroke, from TOAST to CISS. *CNS neuroscience & therapeutics* 18:452-456.
- Chen X, Wen W, Anstey KJ, Sachdev PS (2009) Prevalence, incidence, and risk factors of lacunar infarcts in a community sample. *Neurology* 73:266-272.
- Cheng T, Petraglia AL, Li Z, Thiyagarajan M, Zhong Z, Wu Z, Liu D, Maggirwar SB, Deane R, Fernandez JA, LaRue B, Griffin JH, Chopp M, Zlokovic BV (2006) Activated protein C inhibits tissue plasminogen activator-induced brain hemorrhage. *Nature medicine* 12:1278-1285.

- Chong ZZ, Kang JQ, Maiese K (2004) Essential cellular regulatory elements of oxidative stress in early and late phases of apoptosis in the central nervous system. *Antioxidants & redox signaling* 6:277-287.
- Christensen MC, Valiente R, Sampaio Silva G, Lee WC, Dutcher S, Guimaraes Rocha MS, Massaro A (2009) Acute treatment costs of stroke in Brazil. *Neuroepidemiology* 32:142-149.
- Collins CH, Braga GL, Bonato PS (2006) *Fundamentos de Cromatografia*. Campinas-SP- Brazil: Editora da Unicamp.
- Coll BM (2007) Inflammation and Stroke: Introduction. *Stroke* 38:631.
- Coultrap SJ, Vest RS, Ashpole NM, Hudmon A, Bayer KU (2011) CaMKII in cerebral ischemia. *Acta pharmacologica Sinica* 32:861-872.
- Coyle JT, Puttfarcken P (1993) Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science (New York, NY)* 262:689-695.
- Cozzone AJ (2001) *Proteins: Fundamental Chemical Properties*. In: eLS: John Wiley & Sons, Ltd.
- Crowther MA (2005) Pathogenesis of Atherosclerosis. *ASH Education Program Book* 2005:436-441.
- Cullen P, Baetta R, Bellosta S, Bernini F, Chinetti G, Cignarella A, von Eckardstein A, Exley A, Goddard M, Hofker M, Hurt-Camejo E, Kanters E, Kovanen P, Lorkowski S, McPheat W, Pentikäinen M, Rauterberg J, Ritchie A, Staels B, Weitkamp B, de Winther M, Consortium ftM (2003) Rupture of the Atherosclerotic Plaque: Does a Good Animal Model Exist? *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 23:535-542.
- Daikhin Y, Yudkoff M (2000) Compartmentation of Brain Glutamate Metabolism in Neurons and Glia. *The Journal of nutrition* 130:1026.
- Davies MJ, Richardson PD, Woolf N, Katz DR, Mann J (1993) Risk of thrombosis in human atherosclerotic plaques: role of extracellular lipid, macrophage, and smooth muscle cell content. *British heart journal* 69:377-381.
- Davis S, Lees K, Donnan G (2006) Treating the acute stroke patient as an emergency: current practices and future opportunities. *International journal of clinical practice* 60:399-407.
- de Paiva MJ, Menezes HC, Christo PP, Resende RR, Cardeal Zde L (2013) An alternative derivatization method for the analysis of amino acids in cerebrospinal fluid by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 931:97-102.
- De Paoli G, Bell S (2008) A rapid GC-MS determination of gamma-hydroxybutyrate in saliva. *Journal of analytical toxicology* 32:298-302.

- Deferrari G, Mannucci I, Garibotto G (2001) Amino Acid Biosynthesis. In: eLS: John Wiley & Sons, Ltd.
- Del Bene A, Palumbo V, Lamassa M, Saia V, Piccardi B, Inzitari D (2012) Progressive lacunar stroke: review of mechanisms, prognostic features, and putative treatments. *International journal of stroke : official journal of the International Stroke Society* 7:321-329.
- del Zoppo GJ, Saver JL, Jauch EC, Adams HP, Council obotAHAS (2009) Expansion of the Time Window for Treatment of Acute Ischemic Stroke With Intravenous Tissue Plasminogen Activator: A Science Advisory From the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* 40:2945-2948.
- Di Tullio MR, Homma S (2002) Mechanisms of cardioembolic stroke. *Current cardiology reports* 4:141-148.
- Dichgans M (2007) Genetics of ischaemic stroke. *Lancet Neurol* 6:149-161.
- Donnan GA, Fisher M, Macleod M, Davis SM (2008) Stroke. *Lancet* 371:1612-1623.
- Doyle KP, Simon RP, Stenzel-Poore MP (2008) Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology* 55:310-318.
- Dunn WB, Broadhurst D, Begley P, Zelena E, Francis-McIntyre S, Anderson N, Brown M, Knowles JD, Halsall A, Haselden JN, Nicholls AW, Wilson ID, Kell DB, Goodacre R (2011) Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nat Protocols* 6:1060-1083.
- Dunn WB, Broadhurst D, Ellis DI, Brown M, Halsall A, O'Hagan S, Spasic I, Tseng A, Kell DB (2008) A GC-TOF-MS study of the stability of serum and urine metabolomes during the UK Biobank sample collection and preparation protocols. *International journal of epidemiology* 37 Suppl 1:i23-30.
- Dwivedi P, Schultz AJ, Hill HH (2010) Metabolic Profiling of Human Blood by High Resolution Ion Mobility Mass Spectrometry (IM-MS). *Int J Mass Spectrom* 298:78-90.
- Elkind MSV, Tai W, Coates K, Paik MC, Sacco RL (2009) Lipoprotein-Associated Phospholipase A₂ Activity and Risk of Recurrent Stroke. *Cerebrovascular Diseases* 27:42-50.
- Erecinska M, Nelson D, Wilson DF, Silver IA (1984) Neurotransmitter amino acids in the CNS. I. Regional changes in amino acid levels in rat brain during ischemia and reperfusion. *Brain Res* 304:9-22.
- Fahimfar N, Khalili D, Mohebi R, Azizi F, Hadaegh F (2012) Risk factors for ischemic stroke; results from 9 years of follow-up in a population based cohort of Iran. *BMC Neurology* 12:117.
- Feigin VL, Barker-Collo S, McNaughton H, Brown P, Kerse N (2008) Long-term neuropsychological and functional outcomes in stroke survivors: current evidence and perspectives for new research. *International journal of stroke : official journal of the International Stroke Society* 3:33-40.

- Fernstrom JD (2005) Branched-Chain Amino Acids and Brain Function. *The Journal of nutrition* 135:1539S-1546S.
- Ferrer I, Friguls B, Dalfo E, Justicia C, Planas AM (2003) Caspase-dependent and caspase-independent signalling of apoptosis in the penumbra following middle cerebral artery occlusion in the adult rat. *Neuropathology and applied neurobiology* 29:472-481.
- Ferrer I, Planas AM (2003) Signaling of cell death and cell survival following focal cerebral ischemia: life and death struggle in the penumbra. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 62:329-339.
- Fiehn O (2001) Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. *Comparative and functional genomics* 2:155-168.
- Fiehn O (2002) Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol Biol* 48:155-171.
- Field CJ, Johnson IR, Schley PD (2002) Nutrients and their role in host resistance to infection. *Journal of leukocyte biology* 71:16-32.
- Finkelstein JD (1990) Methionine metabolism in mammals. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 1:228-237.
- Finn AV, Nakano M, Narula J, Kolodgie FD, Virmani R (2010) Concept of Vulnerable/Unstable Plaque. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 30:1282-1292.
- Finsterer J (2010) Management of cryptogenic stroke. *Acta neurologica Belgica* 110:135-147.
- Fishbein MC (2010) The vulnerable and unstable atherosclerotic plaque. *Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology* 19:6-11.
- Gao J, Yang H, Chen J, Fang J, Chen C, Liang R, Yang G, Wu H, Wu C, Li S (2013) Analysis of serum metabolites for the discovery of amino acid biomarkers and the effect of galangin on cerebral ischemia. *Molecular bioSystems* 9:2311-2321.
- Garcia-Berrocoso T, Fernandez-Cadenas I, Delgado P, Rosell A, Montaner J (2010) Blood Biomarkers in Cardioembolic Stroke. *Current cardiology reviews* 6:194-201.
- Gehrke CW, Zumwalt RW, Kuo K (1971) Quantitative amino acid analysis by gas-liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 19:605-618.
- Glushakov AV, Dennis DM, Sumners C, Seubert CN, Martynyuk AE (2003) L-phenylalanine selectively depresses currents at glutamatergic excitatory synapses. *Journal of Neuroscience Research* 72:116-124.

- Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, Benjamin EJ, Berry JD, Blaha MJ, Dai S, Ford ES, Fox CS, Franco S, Fullerton HJ, Gillespie C, Hailpern SM, Heit JA, Howard VJ, Huffman MD, Judd SE, Kissela BM, Kittner SJ, Lackland DT, Lichtman JH, Lisabeth LD, Mackey RH, Magid DJ, Marcus GM, Marelli A, Matchar DB, McGuire DK, Mohler ER, Moy CS, Mussolino ME, Neumar RW, Nichol G, Pandey DK, Paynter NP, Reeves MJ, Sorlie PD, Stein J, Towfighi A, Turan TN, Virani SS, Wong ND, Woo D, Turner MB (2013) Heart Disease and Stroke Statistics—2014 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*.
- Green AR, Shuaib A (2006) Therapeutic strategies for the treatment of stroke. *Drug discovery today* 11:681-693.
- Gunda B, Varallyay G, Rudas G, Bereczki D (2009) Challenges in Diagnosing Cerebral Lacunar Infarcts. *Current Medical Imaging Reviews* 5:75-84.
- Gupta HV, Farrell AM, Mittal MK (2014) Transient ischemic attacks: predictability of future ischemic stroke or transient ischemic attack events. *Therapeutics and clinical risk management* 10:27-35.
- Haacke C, Althaus A, Spottke A, Siebert U, Back T, Dodel R (2006) Long-Term Outcome After Stroke: Evaluating Health-Related Quality of Life Using Utility Measurements. *Stroke* 37:193-198.
- Hacke W, Donnan G, Fieschi C, Kaste M, von Kummer R, Broderick JP, Brott T, Frankel M, Grotta JC, Haley EC, Jr., Kwiatkowski T, Levine SR, Lewandowski C, Lu M, Lyden P, Marler JR, Patel S, Tilley BC, Albers G, Bluhmki E, Wilhelm M, Hamilton S (2004) Association of outcome with early stroke treatment: pooled analysis of ATLANTIS, ECASS, and NINDS rt-PA stroke trials. *Lancet* 363:768-774.
- Halket JM, Zaikin VG (2003) Derivatization in mass spectrometry--1. Silylation. *European journal of mass spectrometry (Chichester, England)* 9:1-21.
- Hassan A, Markus HS (2000) Genetics and ischaemic stroke. *Brain : a journal of neurology* 123:1784-1812.
- Hermann DM, Matter CM (2007) Tissue Plasminogen Activator–Induced Reperfusion Injury After Stroke Revisited. *Circulation* 116:363-365.
- Herve D, Mangin JF, Molko N, Bousser MG, Chabriat H (2005) Shape and volume of lacunar infarcts: a 3D MRI study in cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy. *Stroke* 36:2384-2388.
- Homuth G, Teumer A, Völker U, Nauck M (2012) A description of large-scale metabolomics studies: increasing value by combining metabolomics with genome-wide SNP genotyping and transcriptional profiling. *Journal of Endocrinology* 215:17-28.
- Hübschmann H-J (2008) Fundamentals. In: *Handbook of GC/MS*, pp 7-292: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

- Jackson C, Sudlow C (2005) Are Lacunar Strokes Really Different?: A Systematic Review of Differences in Risk Factor Profiles Between Lacunar and Nonlacunar Infarcts. *Stroke* 36:891-901.
- Jakeman PM (1998) Amino acid metabolism, branched-chain amino acid feeding and brain monoamine function. *The Proceedings of the Nutrition Society* 57:35-41.
- James AT, Martin AJ (1952) Gas-liquid partition chromatography; the separation and micro-estimation of volatile fatty acids from formic acid to dodecanoic acid. *The Biochemical journal* 50:679-690.
- Jantzie LL, Cheung PY, Johnson ST, Bigam DL, Todd KG (2010) Cerebral amino acid profiles after hypoxia-reoxygenation and N-acetylcysteine treatment in the newborn piglet. *Neonatology* 97:195-203.
- Jauch EC, Lindsell C, Broderick J, Fagan SC, Tilley BC, Levine SR, Group ftNr-PSS (2006) Association of Serial Biochemical Markers With Acute Ischemic Stroke: The National Institute of Neurological Disorders and Stroke Recombinant Tissue Plasminogen Activator Stroke Study. *Stroke* 37:2508-2513.
- Jauch EC, Saver JL, Adams HP, Bruno A, Connors JJ, Demaerschalk BM, Khatri P, McMullan PW, Qureshi AI, Rosenfield K, Scott PA, Summers DR, Wang DZ, Wintermark M, Yonas H (2013) Guidelines for the Early Management of Patients With Acute Ischemic Stroke: A Guideline for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* 44:870-947.
- Jiang Z, Sun J, Liang Q, Cai Y, Li S, Huang Y, Wang Y, Luo G (2011) A metabonomic approach applied to predict patients with cerebral infarction. *Talanta* 84:298-304.
- Jickling GC, Sharp FR (2011) Blood biomarkers of ischemic stroke. *Neurotherapeutics* 8:349-360.
- Jin R, Yang G, Li G (2010a) Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells. *Journal of leukocyte biology* 87:779-789.
- Jin R, Yang G, Li G (2010b) Molecular insights and therapeutic targets for blood-brain barrier disruption in ischemic stroke: critical role of matrix metalloproteinases and tissue-type plasminogen activator. *Neurobiology of disease* 38:376-385.
- Jung JY, Lee H-S, Kang D-G, Kim NS, Cha MH, Bang O-S, Ryu DH, Hwang G-S (2011) 1H-NMR-Based Metabolomics Study of Cerebral Infarction. *Stroke* 42:1282-1288.
- Kagiyama T, Glushakov AV, Sumners C, Roose B, Dennis DM, Phillips MI, Ozcan MS, Seubert CN, Martynyuk AE (2004) Neuroprotective Action of Halogenated Derivatives of L-Phenylalanine. *Stroke* 35:1192-1196.
- Kanani H, Chrysanthopoulos PK, Klapa MI (2008) Standardizing GC-MS metabolomics. *Journal of Chromatography B* 871:191-201.

- Karkela J, Marnela KM, Odink J, Koivula T, Kaukinen S (1992) Amino acids and glucose in human cerebrospinal fluid after acute ischaemic brain damage. *Resuscitation* 23:145-156.
- Katan M, Elkind MSV (2011) Inflammatory and neuroendocrine biomarkers of prognosis after ischemic stroke. *Expert review of neurotherapeutics* 11:225-239.
- Kaul S, Munshi A (2012) Genetics of ischemic stroke: Indian perspective. *Neurol India* 60:498-503.
- Kihara AH, Santos TO, Osuna-Melo EJ, Paschon V, Vidal KS, Akamine PS, Castro LM, Resende RR, Hamassaki DE, Britto LR (2010) Connexin-mediated communication controls cell proliferation and is essential in retinal histogenesis. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 28:39-52.
- Kim MH, Kang SY, Kim MC, Lee WI (2010) Plasma biomarkers in the diagnosis of acute ischemic stroke. *Ann Clin Lab Sci* 40:336-341.
- Kimberly WT, Wang Y, Pham L, Furie KL, Gerszten RE (2013) Metabolite profiling identifies a branched chain amino acid signature in acute cardioembolic stroke. *Stroke* 44:1389-1395.
- Kirshner HS (2010) Current issues in antiplatelet therapy for stroke prevention: the importance of stroke subtypes and differences between stroke and MI patients. *Journal of neurology* 257:1788-1797.
- Knauer C, Knauer K, Muller S, Ludolph AC, Bengel D, Muller HP, Huber R (2012) A biochemical marker panel in MRI-proven hyperacute ischemic stroke-a prospective study. *BMC Neurol* 12:1471-2377.
- Koek MM, Jellema RH, van der Greef J, Tas AC, Hankemeier T (2011) Quantitative metabolomics based on gas chromatography mass spectrometry: status and perspectives. *Metabolomics : Official journal of the Metabolomic Society* 7:307-328.
- Kriz J (2006) Inflammation in ischemic brain injury: timing is important. *Critical reviews in neurobiology* 18:145-157.
- Kriz J, Lalancette-Hebert M (2009) Inflammation, plasticity and real-time imaging after cerebral ischemia. *Acta neuropathologica* 117:497-509.
- Kunz A, Dirnagl U, Mergenthaler P (2010) Acute pathophysiological processes after ischaemic and traumatic brain injury. *Best practice & research Clinical anaesthesiology* 24:495-509.
- Kurbat MN, Lelevich VV (2009) Metabolism of amino acids in the brain. *Neurochem J* 3:23-28.
- Lakhan S, Kirchgessner A, Hofer M (2009) Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches. *Journal of Translational Medicine* 7:97.

- Lee E, Vaughan DE, Parikh SH, Grodzinsky AJ, Libby P, Lark MW, Lee RT (1996) Regulation of matrix metalloproteinases and plasminogen activator inhibitor-1 synthesis by plasminogen in cultured human vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 78:44-49.
- Li S, Wu X, Hu X (2008) Gene selection using genetic algorithm and support vectors machines. *Soft Comput* 12:693-698.
- Liu B, Liao M, Mielke JG, Ning K, Chen Y, Li L, El-Hayek YH, Gomez E, Zukin RS, Fehlings MG, Wan Q (2006) Ischemic insults direct glutamate receptor subunit 2-lacking AMPA receptors to synaptic sites. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26:5309-5319.
- Lo EH, Dalkara T, Moskowitz MA (2003) Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. *Nature reviews Neuroscience* 4:399-415.
- Longstaff A (2005) *Neuroscience*. New York: Taylor & Francis Group.
- Lotufo PA (2005) Stroke in Brazil: a neglected disease. *Sao Paulo Medical Journal* 123:3-4.
- Lund RW (2014) Lacunar infarction, mortality over time and mortality relative to other ischemic strokes. *Journal of insurance medicine (New York, NY)* 44:32-37.
- Lynch JR, Blessing R, White WD, Grocott HP, Newman MF, Laskowitz DT (2004) Novel diagnostic test for acute stroke. *Stroke* 35:57-63.
- Maas MB, Furie KL (2009) Molecular biomarkers in stroke diagnosis and prognosis. *Biomark Med* 3:363-383.
- Mackay J MG (2004) Global Burden Stroke. In: *The Atlas of Heart Disease and Stroke*, vol. 1, pp 50-52 World Health Organization and Center for Disease Control and Prevention.
- Mahadevan S, Shah SL, Marrie TJ, Slupsky CM (2008) Analysis of metabolomic data using support vector machines. *Analytical chemistry* 80:7562-7570.
- Mangia S, Giove F, DiNuzzo M (2012) Metabolic Pathways and Activity-Dependent Modulation of Glutamate Concentration in the Human Brain. *Neurochem Res* 37:2554-2561.
- Martin-Villalba A, Herr I, Jeremias I, Hahne M, Brandt R, Vogel J, Schenkel J, Herdegen T, Debatin KM (1999) CD95 ligand (Fas-L/APO-1L) and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand mediate ischemia-induced apoptosis in neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19:3809-3817.
- Martin LJ, Al-Abdulla NA, Brambrink AM, Kirsch JR, Sieber FE, Portera-Cailliau C (1998) Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischemia, and target deprivation: A perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Brain research bulletin* 46:281-309.

- McCabe DJ, Rakhit RD (2007) Antithrombotic and interventional treatment options in cardioembolic transient ischaemic attack and ischaemic stroke. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 78:14-24.
- McCully KS (1969) Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *The American journal of pathology* 56:111-128.
- Miller AL (2003) The methionine-homocysteine cycle and its effects on cognitive diseases. (Homocysteine & Cognitive). In: *Alternative Medicine Review*, vol. 8, p 7+.
- Milot MH, Cramer SC (2008) Biomarkers of recovery after stroke. *Current opinion in neurology* 21:654-659.
- Montaner J, Perea-Gainza M, Delgado P, Ribo M, Chacon P, Rosell A, Quintana M, Palacios ME, Molina CA, Alvarez-Sabin J (2008) Etiologic diagnosis of ischemic stroke subtypes with plasma biomarkers. *Stroke* 39:2280-2287.
- Munshi A, Kaul S (2010) Genetic basis of stroke: an overview. *Neurol India* 58:185-190.
- Murtagh B, Smalling R (2006) Cardioembolic stroke. *Curr Atheroscler Rep* 8:310-316.
- Nachar N (2008) The Mann-Whitney U: A Test for Assessing Whether Two Independent Samples Come from the Same Distribution. *Tutorials in Quantitative Methods for Psychology* vol. 4(1):p. 13-20.
- Nagai T, Yamada K, Yoshimura M, Ishikawa K, Miyamoto Y, Hashimoto K, Noda Y, Nitta A, Nabeshima T (2004) The tissue plasminogen activator-plasmin system participates in the rewarding effect of morphine by regulating dopamine release. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:3650-3655.
- Nam HS, Kim HC, Kim YD, Lee HS, Kim J, Lee DH, Heo JH (2012) Long-Term Mortality in Patients With Stroke of Undetermined Etiology. *Stroke* 43:2948-2956.
- Nelson DL, Cox MM (2008) *Lehninger Principles of Biochemistry*: W. H. Freeman.
- Neurauter G, Schrocksnadel K, Scholl-Burgi S, Sperner-Unterweger B, Schubert C, Ledochowski M, Fuchs D (2008) Chronic immune stimulation correlates with reduced phenylalanine turnover. *Curr Drug Metab* 9:622-627.
- Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E (1999) 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems* 29:1181-1189.
- Nicotera P, Leist M, Fava E, Berliocchi L, Volbracht C (2000) Energy requirement for caspase activation and neuronal cell death. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)* 10:276-282.

- Nour M, Scalzo F, Liebeskind DS (2012) Ischemia-Reperfusion Injury in Stroke. *Interventional Neurology* 1:185-199.
- Obembe AO, Olaogun MO, Bamikole AA, Komolafe MA, Odetunde MO (2014) Awareness of Risk Factors and Warning Signs of Stroke in a Nigeria University. *Journal of stroke and cerebrovascular diseases : the official journal of National Stroke Association* 23:749-758.
- Ocava LC, Singh M, Malhotra S, Rosenbaum DM (2006) Antithrombotic and thrombolytic therapy for ischemic stroke. *Clin Geriatr Med* 22:135-154.
- Ohira T, Shahar E, Chambless LE, Rosamond WD, Mosley TH, Folsom AR (2006) Risk Factors for Ischemic Stroke Subtypes: The Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Stroke* 37:2493-2498.
- Ohtaki H, Dohi K, Nakamachi T, Yofu S, Endo S, Kudo Y, Shioda S (2005) Evaluation of Brain Ischemia in Mice. *ACTA HISTOCHEMICA ET CYTOCHEMICA* 38:99-106.
- Oldendorf WH (1971) Brain uptake of radiolabeled amino acids, amines, and hexoses after arterial injection. *The American journal of physiology* 221:1629-1639.
- Oliveira-Filho J, Martins SCO, Pontes-Neto OM, Longo A, Evaristo EF, Carvalho JFd, Fernandes JG, Zétola VF, Gagliardi RJ, Vedolin L, Freitas GRd (2012) Guidelines for acute ischemic stroke treatment: part I. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria* 70:621-629.
- Ollenschlager G, Jansen S, Schindler J, Rasokat H, Schrappe-Bacher M, Roth E (1988) Plasma amino acid pattern of patients with HIV infection. *Clinical chemistry* 34:1787-1789.
- Palomeras Soler E, Casado Ruiz V (2010) Epidemiology and Risk Factors of Cerebral Ischemia and Ischemic Heart Diseases: Similarities and Differences. *Current cardiology reviews* 6:138-149.
- Pandhare J, Donald SP, Cooper SK, Phang JM (2009) Regulation and function of proline oxidase under nutrient stress. *J Cell Biochem* 107:759-768.
- Paschon V, Higa GSV, Resende RR, Britto LRG, Kihara AH (2012) Blocking of Connexin-Mediated Communication Promotes Neuroprotection during Acute Degeneration Induced by Mechanical Trauma. *PLoS ONE* 7:e45449.
- Pasikanti KK, Ho PC, Chan EC (2008) Gas chromatography/mass spectrometry in metabolic profiling of biological fluids. *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 871:202-211.
- Patti GJ, Yanes O, Siuzdak G (2012) Innovation: Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. *Nature reviews Molecular cell biology* 13:263-269.
- Phang JM (1985) The regulatory functions of proline and pyrroline-5-carboxylic acid. *Current topics in cellular regulation* 25:91-132.

- Pinto MC, de Paiva MJ, Oliveira-Lima OC, Menezes HC, Cardeal Zde L, Gomez MV, Resende RR, Gomez RS (2014) Neurochemical study of amino acids in rodent brain structures using an improved gas chromatography-mass spectrometry method. *Journal of chemical neuroanatomy* 55:24-37.
- Psychogios N, Hau DD, Peng J, Guo AC, Mandal R, Bouatra S, Sinelnikov I, Krishnamurthy R, Eisner R, Gautam B, Young N, Xia J, Knox C, Dong E, Huang P, Hollander Z, Pedersen TL, Smith SR, Bamforth F, Greiner R, McManus B, Newman JW, Goodfriend T, Wishart DS (2011) The Human Serum Metabolome. *PLoS ONE* 6:e16957.
- Quah JL, Yap S, Cheah SO, Ng YY, Goh ES, Doctor N, Leong BS, Tiah L, Chia MY, Ong ME (2014) Knowledge of signs and symptoms of heart attack and stroke among Singapore residents. *BioMed research international* 2014:572425.
- Quinones MP, Kaddurah-Daouk R (2009) Metabolomics tools for identifying biomarkers for neuropsychiatric diseases. *Neurobiology of disease* 35:165-176.
- Ramadan Z, Jacobs D, Grigorov M, Kochhar S (2006) Metabolic profiling using principal component analysis, discriminant partial least squares, and genetic algorithms. *Talanta* 68:1683-1691.
- Rath T, Roth E, Keidl R, Meissl G (1987) Phenylalanine: total amino acid ratio in 45 burn patients. *Scandinavian journal of plastic and reconstructive surgery and hand surgery / Nordisk plastikkirurgisk forening [and] Nordisk klubb for handkirurgi* 21:297-300.
- Ravaglia G, Forti P, Maioli F, Bianchi G, Martelli M, Talerico T, Servadei L, Zoli M, Mariani E (2004) Plasma amino acid concentrations in patients with amnesic mild cognitive impairment or Alzheimer disease. *The American Journal of Clinical Nutrition* 80:483-488.
- Ribani M, Bottoli CBG, Collins CH, Jardim ICSF, Melo LFC (2004) Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova* 27:771-780.
- Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, Benjamin EJ, Berry JD, Borden WB, Bravata DM, Dai S, Ford ES, Fox CS, Fullerton HJ, Gillespie C, Hailpern SM, Heit JA, Howard VJ, Kissela BM, Kittner SJ, Lackland DT, Lichtman JH, Lisabeth LD, Makuc DM, Marcus GM, Marelli A, Matchar DB, Moy CS, Mozaffarian D, Mussolino ME, Nichol G, Paynter NP, Soliman EZ, Sorlie PD, Sotoodehnia N, Turan TN, Virani SS, Wong ND, Woo D, Turner MB (2011) Heart Disease and Stroke Statistics—2012 Update. *Circulation*.
- Roth E, Zoch G, Schulz F, Karner J, Muhlbacher F, Hamilton G, Mauritz W, Sporn P, Funovics J (1985) Amino acid concentrations in plasma and skeletal muscle of patients with acute hemorrhagic necrotizing pancreatitis. *Clinical chemistry* 31:1305-1309.
- Rothwell PM (2007) Atherothrombosis and ischaemic stroke. *BMJ* 334:379-380.
- Ruff CT (2012) Stroke Prevention in Atrial Fibrillation. *Circulation* 125:e588-e590.

- Sacco RL, Ellenberg JH, Mohr JP, Tatemichi TK, Hier DB, Price TR, Wolf PA (1989) Infarcts of undetermined cause: the NINCDS Stroke Data Bank. *Annals of neurology* 25:382-390.
- Saenger AK, Christenson RH (2010) Stroke biomarkers: progress and challenges for diagnosis, prognosis, differentiation, and treatment. *Clinical chemistry* 56:21-33.
- Sanderson T, Reynolds C, Kumar R, Przyklenk K, Hüttemann M (2013) Molecular Mechanisms of Ischemia–Reperfusion Injury in Brain: Pivotal Role of the Mitochondrial Membrane Potential in Reactive Oxygen Species Generation. *Molecular neurobiology* 47:9-23.
- Saposnik G (2012) What Is Certain When the Stroke Etiology Is Uncertain? *Stroke* 43:2841-2842.
- Shalaby EA (2013) Biofuel: Sources, Extraction and Determination Liquid, Gaseous and Solid Biofuels. InTech: Zhen Fang.
- Sims NR, Muyderman H (2010) Mitochondria, oxidative metabolism and cell death in stroke. *Biochimica et biophysica acta* 1802:80-91.
- Smith QR, Momma S, Aoyagi M, Rapoport SI (1987) Kinetics of neutral amino acid transport across the blood-brain barrier. *Journal of neurochemistry* 49:1651-1658.
- Sneddon J, Masuram S, Richert JC (2007) Gas Chromatography-Mass Spectrometry-Basic Principles, Instrumentation and Selected Applications for Detection of Organic Compounds. *Analytical Letters* 40:1003-1012.
- Stamova B, Xu H, Jickling G, Bushnell C, Tian Y, Ander BP, Zhan X, Liu D, Turner R, Adamczyk P, Khoury JC, Pancioli A, Jauch E, Broderick JP, Sharp FR (2010) Gene expression profiling of blood for the prediction of ischemic stroke. *Stroke* 41:2171-2177.
- Stankowski JN, Gupta R (2011) Therapeutic targets for neuroprotection in acute ischemic stroke: lost in translation? *Antioxidants & redox signaling* 14:1841-1851.
- Sudlow CLM, Warlow CP, Collaboration ftISI (1997) Comparable Studies of the Incidence of Stroke and its Pathological Types: Results From an International Collaboration. *Stroke* 28:491-499.
- Szymanska E, Saccenti E, Smilde AK, Westerhuis JA (2012) Double-check: validation of diagnostic statistics for PLS-DA models in metabolomics studies. *Metabolomics : Official journal of the Metabolomic Society* 8:3-16.
- Tehlivets O (2011) Homocysteine as a Risk Factor for Atherosclerosis: Is Its Conversion to S-Adenosyl-L-Homocysteine the Key to Deregulated Lipid Metabolism? *Journal of Lipids* 2011:11.
- Teófilo RF (2007) Chemometric methods in the electrochemical studies of phenols on boron-doped diamond films. In: Department of chemistry. Campinas- SP: Federal University of Campinas.

- Teófilo RF, Martins JPA, Ferreira MMC (2009) Sorting variables by using informative vectors as a strategy for feature selection in multivariate regression. *Journal of Chemometrics* 23:32-48.
- Thurman RJ, Jauch EC (2002) Acute ischemic stroke: emergent evaluation and management. *Emergency medicine clinics of North America* 20:609-630, vi.
- Timsit S, Breuille C (2009) [Cryptogenic cerebral infarction: from classification to concept]. *Presse medicale (Paris, France : 1983)* 38:1832-1842.
- Tobias RD (1999) *Chemometrics: A Practical Guide*. *Technometrics* 41:375-376.
- Truelsen T (2010) Stroke incidence studies in Africa. *The Lancet Neurology* 9:755-757.
- Umbarger HE (1978) Amino acid biosynthesis and its regulation. *Annual review of biochemistry* 47:532-606.
- Vapnik V (2006) *Estimation of Dependences Based on Empirical Data*: Springer-Verlag New York, Inc.
- Villas-Boas SG, Rasmussen S, Lane GA (2005) Metabolomics or metabolite profiles? *Trends in biotechnology* 23:385-386.
- Villas-Boas SG, Smart KF, Sivakumaran S, Lane GA (2011) Alkylation or Silylation for Analysis of Amino and Non-Amino Organic Acids by GC-MS? *Metabolites* 1:3-20.
- Waagepetersen HS, Sonnewald U, Larsson OM, Schousboe A (2000) A possible role of alanine for ammonia transfer between astrocytes and glutamatergic neurons. *Journal of neurochemistry* 75:471-479.
- Wang DC, Sun CH, Liu LY, Sun XH, Jin XW, Song WL, Liu XQ, Wan XL (2012) Serum fatty acid profiles using GC-MS and multivariate statistical analysis: potential biomarkers of Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging* 33:1057-1066.
- Wang Q, Tang XN, Yenari MA (2007) The inflammatory response in stroke. *Journal of neuroimmunology* 184:53-68.
- Wardlaw JM (2005) What causes lacunar stroke? *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 76:617-619.
- Watanabe A, Higashi T, Sakata T, Nagashima H (1984) Serum amino acid levels in patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer* 54:1875-1882.
- Weir NU (2008) An update on cardioembolic stroke. *Postgraduate Medical Journal* 84:133-142.
- Wessels T, Rottger C, Jauss M, Kaps M, Traupe H, Stolz E (2005) Identification of embolic stroke patterns by diffusion-weighted MRI in clinically defined lacunar stroke syndromes. *Stroke* 36:757-761.

- White BC, Sullivan JM, DeGracia DJ, O'Neil BJ, Neumar RW, Grossman LI, Rafols JA, Krause GS (2000) Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. *Journal of the neurological sciences* 179:1-33.
- Whiteley W, Tseng M-C, Sandercock P (2008) Blood Biomarkers in the Diagnosis of Ischemic Stroke: A Systematic Review. *Stroke* 39:2902-2909.
- Widner B, Fuchs D, Leblhuber F, Sperner-Unterweger B (2001) Does disturbed homocysteine and folate metabolism in depression result from enhanced oxidative stress? *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 70:419.
- Wishart DS, Jewison T, Guo AC, Wilson M, Knox C, Liu Y, Djombou Y, Mandal R, Aziat F, Dong E, Bouatra S, Sinelnikov I, Arndt D, Xia J, Liu P, Yallou F, Bjorn Dahl T, Perez-Pineiro R, Eisner R, Allen F, Neveu V, Greiner R, Scalbert A (2012) HMDB 3.0—The Human Metabolome Database in 2013. *Nucleic Acids Research*.
- Worley B, Powers R (2013) Multivariate Analysis in Metabolomics. *Current Metabolomics* 1:92-107.
- Wu G (2009) Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids* 37:1-17.
- Wu G (2010) Functional Amino Acids in Growth, Reproduction, and Health. *Advances in Nutrition: An International Review Journal* 1:31-37.
- Wu Z, Huang Z, Lehmann R, Zhao C, Xu G (2009) The Application of Chromatography-Mass Spectrometry: Methods to Metabonomics. *Chroma* 69:23-32.
- Wyse AT, Netto CA (2011) Behavioral and neurochemical effects of proline. *Metabolic brain disease* 26:159-172.
- Yew KS, Cheng E (2009) Acute stroke diagnosis. *American family physician* 80:33-40.
- Yoo AJ, Pulli B, Gonzalez RG (2011) Imaging-based treatment selection for intravenous and intra-arterial stroke therapies: a comprehensive review. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 9:857-876.
- Yousef Mohammad MQaSP (2010) Epidemiology and Pathophysiology of Intracranial Large Artery Stenosis. *The Open Atherosclerosis & Thrombosis Journal* 3:3-7.
- Yuan J, Yankner BA (2000) Apoptosis in the nervous system. *Nature* 407:802-809.
- Yudkoff M (1997) Brain metabolism of branched-chain amino acids. *Glia* 21:92-98.
- Yudkoff M, Daikhin Y, Lin ZP, Nissim I, Stern J, Pleasure D, Nissim I (1994) Interrelationships of leucine and glutamate metabolism in cultured astrocytes. *Journal of neurochemistry* 62:1192-1202.

- Zaikin VG, Halket JM (2005) Review: derivatization in mass spectrometry-6. Formation of mixed derivatives of polyfunctional compounds. *European journal of mass spectrometry* (Chichester, England) 11:611-636.
- Zauner A, Daugherty WP, Bullock MR, Warner DS (2002) Brain oxygenation and energy metabolism: part I-biological function and pathophysiology. *Neurosurgery* 51:289-301; discussion 302.
- Zhang G-F, Sadhukhan S, Tochtrop GP, Brunengraber H (2011) Metabolomics, Pathway Regulation, and Pathway Discovery. *Journal of Biological Chemistry* 286:23631-23635.

APÊNDICE

Apêndice A - TCLE paciente

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(TCLE)

Biomarcadores de Acidente Vascular Isquêmico

Prezado(a), _____

- Você está sendo convidado (a) a participar de um projeto de pesquisa.
- Por favor, leia atentamente todo este documento.
- Esclareça suas dúvidas com a equipe médica ou de pesquisadores que fazem parte desse estudo.
- Confirme sua participação através da assinatura deste termo.

Qual o objetivo desse estudo?

É avaliar se variações presentes no seu metabolismo e no seu DNA podem auxiliar na identificação do Acidente Vascular Cerebral Isquêmico.

Por que fui escolhido?

Este estudo envolverá pessoas de ambos os sexos com idade entre 25 e 85 anos que forem admitidas no setor de acompanhamento da neurologia da Santa Casa de Belo Horizonte. Serão excluídos deste estudo indivíduos com doenças degenerativas crônicas, cardiopatia chagásica, doença tireoidiana, doença renal crônica, tumores malignos, trauma e alcoólatras.

Sou obrigado a participar?

Nenhum paciente é obrigado a participar, sendo sua participação voluntária e podendo abandoná-lo em qualquer momento, sem prejuízo do seu tratamento ou perda de benefícios.

Quais os riscos e benefícios de participar do estudo?

Este estudo envolve coleta de dados de história clínica, exame físico e coleta de sangue venoso, sendo os riscos apenas os inerentes a este procedimento. No momento da coleta de sangue poderá haver alguma dor decorrente da punção da pele. Complicações de coleta de sangue são raras e geralmente de pequeno porte. Se houver pequena perda de sangue da veia no local da punção poderá ocorrer um pequeno desconforto que desaparece em poucos dias. A equipe médica estará prontamente disponível no caso de qualquer eventualidade. O paciente não receberá nenhum benefício por participar, mas poderá contribuir para o conhecimento sobre novos métodos para o diagnóstico de AVCI.

E o que acontece com as informações deste estudo?

As informações coletadas nesse estudo serão armazenadas, codificadas e datadas por um período de 10 anos. Será mantido sigilo absoluto sobre os dados pessoais do paciente, os quais serão utilizados somente para fins acadêmicos e científicos.

Qual a minha participação? Quais as etapas do estudo?

Sua participação neste estudo envolverá a coleta de 20 ml de sangue venoso utilizando técnicas adequadas. Este volume é cerca de 20 vezes menor ao volume de sangue habitualmente doado quando um indivíduo doa sangue para bancos de sangue. Este sangue será utilizado para realizar todas as dosagens importantes neste estudo.

Terei custos ao participar desse estudo? Receberei alguma ajuda financeira?

Não haverá custos ou nenhuma compensação financeira neste estudo.

Contatos da equipe médica e de pesquisa:

Prof Dr Paulo Pereira Christo (Santa Casa)- ppchristo@gmail.com - Tel: (31)9950-1051

Profa Dra Valéria Cristina Sandrim (Santa Casa)- valsandrin@yahoo.com.br- Tel: (31) 8866-6108

Prof Dr Rodrigo Ribeiro Resende (UFMG)- rrresende@hotmail.com- Tel: (31)9129-3901

COEP-Comitê de Ética em Pesquisa (UFMG)

Unidade Administrativa II - 2º andar- sala 2005

Campus Pampulha - Tel: (31)3409-4592

Belo Horizonte, MG-Brasil

31270-901

Dessa maneira:

1. Informo que li o documento acima, retirei as dúvidas e compreendi de maneira satisfatória sobre a minha participação neste estudo.
2. Entendo que minha participação é voluntária e posso recusar em participar em qualquer momento, sem prejuízo para minha saúde ou tratamento.
3. Compreendo que o material coletado (Sangue venoso) será utilizado apenas para fins científicos bem como autorizo o uso dessas informações para fins de publicação científica.

Nome por extenso do Paciente: _____

Data: _____

Assinaturas:

Pesquisador

Paciente

Apêndice B - TCLE responsável

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(TCLE)

Biomarcadores de Acidente Vascular Isquêmico

Prezado (a), o paciente _____

está sendo convidado(a) a participar de um projeto de pesquisa.

- Como principal responsável pelo paciente citado acima, por favor, leia atentamente todo este documento.
- Esclareça suas dúvidas com a equipe médica ou de pesquisadores que fazem parte desse estudo.
- Após, se concordar autorize a participação do paciente através da assinatura deste termo.

Qual o objetivo desse estudo?

É avaliar se variações presentes no metabolismo e no DNA podem auxiliar no diagnóstico do Acidente Vascular Cerebral Isquêmico.

Por que o paciente em questão foi escolhido?

Este estudo envolverá pessoas de ambos os sexos com idade entre 25 e 85 anos que forem admitidas no setor de acompanhamento da neurologia da Santa Casa de Belo Horizonte. Serão excluídos deste estudo indivíduos com doenças degenerativas crônicas, cardiopatia chagásica, doença tireoidiana, doença renal crônica, tumores malignos, trauma e alcoólatras.

O paciente é obrigado a participar?

Nenhum paciente é obrigado a participar, sendo sua participação voluntária e podendo abandoná-lo em qualquer momento, sem prejuízo do seu tratamento ou perda de benefícios.

Quais os riscos e benefícios de participar do estudo?

Este estudo envolve coleta de dados de história clínica, exame físico e coleta de sangue venoso, sendo os riscos apenas os inerentes a este procedimento. No momento da coleta de sangue poderá haver alguma dor decorrente da punção da pele. Complicações de coleta de sangue são raras e geralmente de pequeno porte. Se houver pequena perda de sangue da veia no local da punção poderá ocorrer um pequeno desconforto que desaparece em poucos dias. A equipe médica estará prontamente disponível no caso de qualquer eventualidade. O paciente não receberá nenhum benefício por participar, mas poderá contribuir para o conhecimento sobre novos métodos para o diagnóstico de AVCI.

E o que acontece com as informações deste estudo?

As informações coletadas nesse estudo serão armazenadas, codificadas e datadas por um período de 10 anos. Será mantido sigilo absoluto sobre os dados pessoais do paciente, os quais serão utilizados somente para fins acadêmicos e científicos.

Qual será a participação do paciente? Quais são as etapas do estudo?

A participação do paciente neste estudo envolverá a coleta de 20 ml de sangue venoso utilizando técnicas adequadas. Este volume é cerca de 20 vezes menor ao volume de sangue habitualmente doado quando um indivíduo doa sangue para bancos de sangue. Este sangue será utilizado para realizar todas as dosagens importantes neste estudo.

Terei custos ao participar desse estudo? Receberei alguma ajuda financeira?

Não haverá custos ou nenhuma compensação financeira neste estudo.

Contatos da equipe médica e de pesquisa:

Prof Dr Paulo Pereira Christo (Santa Casa)- ppchristo@gmail.com - Tel: (31)9950-1051

Profa Dra Valéria Cristina Sandrim (Santa Casa)- valsandrin@yahoo.com.br- Tel: (31) 8866-6108

Prof Dr Rodrigo Ribeiro Resende (UFMG)- rrresende@hotmail.com- Tel: (31)9129-3901

COEP-Comitê de Ética em Pesquisa(UFMG)

Unidade Administrativa II - 2º andar- sala 2005

Campus Pampulha - Tel: (31)3409-4592

Belo Horizonte, MG-Brasil

31270-901

Dessa maneira:

4. Informo que li o documento acima, retirei as dúvidas e compreendi de maneira satisfatória sobre a participação do paciente, do qual sou responsável, neste estudo.
5. Entendo que a participação é voluntária e posso recusar a participação em qualquer momento, sem prejuízo para a saúde ou tratamento do paciente.
6. Compreendo que o material coletado (Sangue venoso) será utilizado apenas para fins científicos bem como autorizo o uso dessas informações para fins de publicação científica.

Nome por extenso do responsável legal: _____

Data: _____

Assinaturas:

Pesquisador

Responsável

Apêndice C - TCLE controles

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(TCLE)

Biomarcadores de Acidente Vascular Isquêmico

Prezado (a), _____

- Você está sendo convidado (a) a participar de um projeto de pesquisa.
- Por favor, leia atentamente todo este documento.
- Esclareça suas dúvidas com a equipe médica ou de pesquisadores que fazem parte desse estudo.
- Confirme sua participação através da assinatura deste termo.

Qual o objetivo desse estudo?

É avaliar se variações presentes no metabolismo e no DNA podem identificar o desenvolvimento do Acidente Vascular Cerebral Isquêmico. Para tanto, precisaremos de amostras de sangue de indivíduos que já tiveram a doença e de indivíduos que nunca tiveram.

Por que fui escolhido?

Este estudo envolverá pessoas de ambos os sexos com idade entre 25 e 85 anos que forem admitidas no setor de acompanhamento da neurologia da Santa Casa de Belo Horizonte. Serão excluídos deste estudo indivíduos com doenças degenerativas crônicas, cardiopatia chagásica, doença tireoidiana, doença renal crônica, tumores malignos, trauma e alcoólatras.

Sou obrigado a participar?

Nenhum indivíduo é obrigado a participar, sendo sua participação voluntária e podendo abandoná-lo em qualquer momento, sem prejuízo do seu tratamento ou perda de benefícios.

Quais os riscos e benefícios de participar do estudo?

Este estudo envolve coleta de dados de história clínica, exame físico e coleta de sangue venoso, sendo os riscos apenas os inerentes a este procedimento. No momento da coleta de sangue poderá haver alguma dor decorrente da punção da pele. Complicações de coleta de sangue são raras e geralmente de pequeno porte. Se houver pequena perda de sangue da veia no local da punção poderá ocorrer um pequeno desconforto que desaparece em poucos dias. A equipe médica estará prontamente disponível no caso de qualquer eventualidade. O paciente não receberá nenhum benefício por participar, mas poderá contribuir para o conhecimento sobre novos métodos para o diagnóstico de AVCI.

E o que acontece com as informações deste estudo?

As informações coletadas nesse estudo serão armazenadas, codificadas e datadas por um período de 10 anos. Será mantido sigilo absoluto sobre os dados pessoais do paciente, os quais serão utilizados somente para fins acadêmicos e científicos.

Qual a minha participação? Quais as etapas do estudo?

Sua participação neste estudo envolverá a coleta de 20 ml de sangue venoso utilizando técnicas adequadas. Este volume é cerca de 20 vezes menor ao volume de sangue habitualmente doado quando um indivíduo doa sangue para bancos de sangue. Este sangue será utilizado para realizar todas as dosagens importantes neste estudo.

Terei custos ao participar desse estudo? Receberei alguma ajuda financeira?

Não haverá custos ou nenhuma compensação financeira neste estudo.

Contatos da equipe médica e de pesquisa:

Prof Dr Paulo Pereira Christo (Santa Casa)- ppchristo@gmail.com - Tel: (31)9950-1051

Profa Dra Valéria Cristina Sandrim (Santa Casa)- valsandrin@yahoo.com.br- Tel: (31) 8866-6108

Prof Dr Rodrigo Ribeiro Resende (UFMG)- rrresende@hotmail.com- Tel: (31)9129-3901

COEP-Comitê de Ética em Pesquisa(UFMG)

Unidade Administrativa II - 2º andar- sala 2005

Campus Pampulha - Tel: (31)3409-4592

Belo Horizonte, MG-Brasil

31270-901

Dessa maneira:

7. Informo que li o documento acima, retirei as dúvidas e compreendi de maneira satisfatória sobre a minha participação neste estudo.
8. Entendo que minha participação é voluntária e posso recusar em participar em qualquer momento, sem prejuízo para minha saúde ou tratamento.
9. Compreendo que o material coletado (Sangue venoso) será utilizado apenas para fins científicos bem como autorizo o uso dessas informações para fins de publicação científica.

Nome por extenso do Paciente: _____

Data: _____

Assinaturas:

Pesquisador

Paciente

Apêndice D - Coeficientes angulares obtidos através das curvas de calibração e valores da massa molar dos aminoácidos

Aminoácidos	Massa Molar (MM)	Coeficiente angular (a)	Coeficiente de regressão linear (b)
Alanina	89,09	1168000	434221
Glicina	75,07	899247	301046
Sarcosina	89,09	850375	235305
Valina	117,15	915507	220044
Leucina	131,17	837612	326309
Isoleucina	131,17	808689	266985
Serina	105,09	748732	374779
Treonina	119,12	321418	96433
Ácido Aspartico	133,1	463283	460894
Metionina	149,21	400189	294273
Prolina	115,13	172777	29133
Cisteína	121,15	1720	427,5
Ácido Glutâmico	147,13	150670	145171
Fenilalanina	165,19	384615	140424
Asparagina	132,12	37772	201,98
Lisina	146,19	40832	45595

Apêndice E - Valores das áreas dos picos encontradas para os aminoácidos

Amostras	Alanina	Glicina	Sarcosina	Valina	Leucina	Isoleucina	Serina	Treonina	Ácido Aspártico	Metionina	Prolina	Cisteína	Ácido Glutâmico	Fenilalanina	Asparagina	Lisina
Aterotrombótico																
2	320080	27545	71970	246113	59765	1373	18815	3446	427	2013	61905	170120	4269	1822	819	545
4	2388360	115675	55390	125093	36270	110	43999	10073	347	959	44427	149291	11320	4093	546	372
9	1107808	40088	25768	639064	419800	1580	13293	26822	3394	1130	395163	186667	9684	3310	6181	705
10	1687831	218057	70006	908673	365862	2044	26418	45332	5545	1348	775564	221914	7539	2947	1484	797
13	1315316	47806	85274	869198	409055	167202	33265	60325	12138	357	1992967	246709	14484	5520	1527	672
14	1404960	430502	98183	884789	530369	1312	50309	64714	13104	459	1610105	274969	9986	3870	2075	299
18	853084	80852	74950	352008	183323	1550	6012	31106	4593	2324	823021	278352	14521	4957	1224	510
22	1114782	58192	156684	670604	366724	1926	7620	21713	7454	624	1285529	242067	11980	4568	1861	368
23	2706021	137091	67897	1414591	758578	3375	40564	46295	10150	209	1439859	630664	22054	8266	2664	301
24	1490242	179913	42714	451385	210877	112237	10395	31704	10901	1363	1597374	355546	7666	2946	710	454
26	885403	123975	107756	586642	234784	1583	23613	21568	6883	2313	801604	344693	15483	5513	1224	406
30	1842571	261024	9130	755655	521940	1359	42074	27234	10456	885	1168230	178584	7716	3245	2483	584
38	933454	193974	27359	578057	216719	120912	25964	22283	7758	295	866724	266342	14417	5438	1290	398
39	586194	52274	93840	362782	139427	2097	630	4567	1723	4191	172838	686896	9724	3670	3599	669
40	641345	36871	15019	449605	229329	1462	1444	4523	5621	2697	599279	436482	9728	3614	970	113
41	1574637	100972	124630	1137134	461878	2394	10406	49752	15277	1027	1773193	626113	15513	5588	4043	699
45	527979	37949	143930	312732	130654	2548	1548	18964	7932	143	851743	285627	16516	5525	5790	383
57	1323908	416246	78856	195	195	67	27	83	6	90	85	46	145	46	173	124
62	24601	90958	302949	263401	68433	52416	7715	6688	14372	4240	9078380	201825	72507	50977	5830	1447
74	5065718	1796260	259143	1827452	264410	157886	53542	62200	142557	5155	7599106	214504	502100	272418	5970	3310
Cardioembólico																
6	573211	26494	72337	411586	177075	466	3423	2927	1882	794	266332	89221	2393	918	1211	414
7	528899	51970	45679	347343	99803	37679	29019	3797	280	1490	53946	143441	7339	2835	806	341
12	1794276	206502	78219	1237438	597516	2489	29259	49950	6776	1436	884836	183339	6291	2686	1158	470
52	553928	88284	78796	194312	26930	21982	6655	6662	14009	1449	3115574	81340	34488	51347	2341	1119
56	19801	20079	65159	88253	14775	969	1142	1948	528	170	1782591	52921	360	3648	1642	841
60	1072168	120144	72150	124593	12220	8921	945	1772	1206	606	1327825	33243	10596	7797	978	387
69	3313	5368	134935	8257	5855	3385	885	2316	9974	2218	3226824	795492	39	117	17	133
94	5804538	1133706	175906	1297777	174327	87392	19393	16886	16962	6569	5231195	366759	131409	61807	14466	11719
95	3566103	1468240	43169	1882530	412955	264291	58854	60774	100106	5588	11881342	236263	444473	305917	56466	3894
109	2593	1174	29023	9193	2848	3861	1719	2207	10377	2561	3643929	225369	871	14156	8287	4785
117	21060	29309	93820	177920	27831	4150	1197	10350	2025	1057	326557	1941891	47968	17184	7863	1550
131	7959	87952	36519	321753	86209	68974	14240	15973	13278	3191	7624134	355500	51121	56740	9099	1975
134	5611117	2207567	128153	2457704	916492	619697	205597	137473	289415	7867	8555047	317056	1156856	438246	5615	4072
138	10133000	2785853	10974566	4375379	1349095	1031593	390331	230509	59554	6315	9573	225993	684778	358601	7616	4810
145	9999990	1305794	398744	5449876	1570012	1197279	245744	185035	473	6216	0	229841	564285	314240	5336	6190
152	94830	23335	74609	30855	2552	1707	4601	3223	1164	200	2241	1981677	11929	4652	2756	1760
156	458803	41573	28377	106605	1157	3647	991	26260	5088	116	271710	766877	16945	7824	3586	437
159	673928	36403	98497	925040	5240	1386	3336	33486	1899	677	97142	838193	22138	8717	3642	2888
Lacunar																
1	4522539	47958	72667	477780	216163	238	16069	2267	370	1572	55645	231582	4351	1654	231	885
15	20048	60621	71641	89562	8795	3641	1304	6258	3928	1250	425510	2240217	34119	12903	10702	958
17	862317	91923	85721	479539	195650	93168	11358	26104	8058	3385	546481	535594	21255	4191	781	1269
46	1993382	163831	189317	2141003	1089017	7175	73918	87631	18856	408	2409824	992643	32474	10870	9816	686
47	251245	4080	167080	250397	74056	2170	354	8068	8601	214	793631	479099	16119	5276	11768	1158

48	1316522	57322	225630	931813	331654	4637	8607	45253	12561	133	1033691	1177341	7930	5303	8737	787
49	487758	10071	109936	405641	132428	2693	4500	15109	15558	1561	1349226	794248	17994	6706	4158	660
53	760646	143426	147942	219558	29065	18625	9484	11052	9635	716	1145401	686676	51682	25563	1029	198
59	89789	23513	63722	2681	11449	11358	4065	4442	11062	906	1930560	52864	39087	36684	935	1084
65	175130	17744	61389	87685	12950	12714	214	663	932	50	443455	31224	1979	1997	543	254
68	367878	21592	65595	134091	15175	9515	2849	2832	2700	510	1286815	62026	19194	11990	2169	841
70	180284	47632	221363	516888	64027	52680	5675	6555	4684	2829	9547075	171990	648	10558	5977	5464
77	2869337	1481688	61932	1642624	67	301885	161510	101324	98015	7278	10309071	207246	178837	181822	6498	2360
88	10896	82394	21613	69936	42721	1133	116	111	44	45	30	206596	9055	25344	5190	2414
99	312226	49374	8062005	516887	98325	86250	19601	19320	50465	4772	9301144	249741	266207	170413	6776	2007
103	5668676	1627076	66039	1310317	187016	148355	28648	31592	143029	7549	16189920	279446	198001	191758	13011	2087
113	9328	28237	174820	10485	9526	7155	2618	2078	1538	2261	2891324	142519	1378	16271	5307	3063
115	99858	42893	116953	99990	2828	1174	923	8490	672	3026	10879	2018752	28368	12202	10473	802
119	4895486	339761	204992	3471719	727719	499506	169810	73553	248611	6939	15370688	188912	834163	407026	6495	2169
121	90768	94261	396788	484545	85155	58364	26082	19268	44926	4857	17404	392464	325022	202011	9716	5020
Indeterminado																
31	3883583	579163	22990	1473233	424242	1528	66900	96630	27766	776	2913036	367547	15071	6312	1919	472
42	1526810	36652	139007	986395	496567	245736	9584	40003	17954	280	1647851	933860	24767	9161	10071	1235
43	1170859	160396	132791	1096848	534032	220480	32412	38510	27233	1367	1644647	1012687	36637	11985	3066	1215
51	612205	225340	111471	399963	66891	43825	5430	6297	21492	1809	2661680	56237	50318	61647	2208	1323
64	24862	4434	5909798	2331	77	1212	609	779	2205	131	1129395	43092	93	3726	1889	663
66	2030	74799	62961	2001	68	374	452	830	838	339	395602	72887	192	6347	2595	734
76	4570585	1850607	3826832	2423868	489511	293183	42179	45568	157411	5164	10705457	211925	250818	276158	12604	4697
78	4801026	2449607	71058	1810044	510516	291672	152252	89332	45577	4755	0	212881	356722	380305	5226	4017
79	10896	82394	21613	69936	42721	1133	116	111	44	45	30	206596	9055	25344	5190	2414
81	7558329	1633453	119041	2048250	258523	178159	38221	31172	69987	3546	8552920	285273	311002	156325	7192	2985
97	7797	92862	25358	8356	38582	32593	18825	9529	10494	2774	7437713	147979	23671	24706	8516	4148
140	8136010	3151907	142147	5503836	1968754	1446498	658679	292690	244563	7117	14547424	319942	715150	480843	9633	5583
147	8268916	3493769	100665	2371390	638747	410826	715765	537843	132575	5757	12163216	249053	260961	326699	11034	5182
166	2934831	31817	56457	54732	511	347	442	10169	304	592	1032	155624	27760	12155	1596	274
187	1212025	35957	89239	691097	17565	5411	16006	40259	6721	335	342812	905651	20245	7354	1104	583
Controles																
8	5125359	56646	5095291	535078	17100	1697	79042	13990	1821	4592	9685	54548	13883	5022	2551	792
10	1837929	78861	50896	810027	43027	2044	28480	90998	1834	3309	42959	549316	9098	3159	1161	1056
11	8927266	92875	50182	774971	12951	4557	6452	15492	726233	1988	43068	333386	18003	7269	2030	4402
12	2417287	74893	38887	1152285	19761	9082	220570	128199	262346	5050	498921	735325	14472	6045	3387	928
13	2860953	22346	5141	122368	2154	1991	36	4078	2682	6135	8312	799519	7358	2622	493	242
14	645866	73093	132239	312663	9460	2758	2225	9943	5804	8607	27788	1460626	8765	4999	1588	433
15	423777	31621	81540	353205	135992	1726	4168	5416	1595	2936	234957	343273	17554	6270	1225	668
18	95364	45673	154445	570536	27870	3401	622	12885	11283	195	957637	1260527	30962	11736	8742	2019
20	2055817	165433	195594	811842	156050	945	0	73	70	95	92	93	10330	4160	2202	2535
23	3153885	228579	182055	604138	16831	2405	36254	10710	11246	9311	381252	1548454	22777	10410	38164	1043
38	3212513	38917	48526	1001083	21667	5875	62495	61111	25848	7454	1127140	0	22126	8206	3370	382
62	6805056	224287	106581	944059	173857	7457	47907	24482	18545	3712	1007339	517582	33256	11629	20194	796
64	7813660	87253	114924	340470	48553	3987	13079	4359	5913	948	275790	176799	19083	6835	11827	918
67	2632133	40765	51122	997225	17479	4379	30469	10297	2386	4944	1864556	661822	37730	13381	1866	802
79	3969790	34147	19557	337531	2630	768	13033	12314	5223	7652	6196	78752	17920	5752	792	1995
84	2350194	45510	124683	580339	11363	4210	8928	6042	3603	7284	28407	78356	28610	8702	717	3190

ANEXOS

Anexo A -Parecer consubstanciado do CEP da UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise do perfil metabólico e de expressão gênica em amostras de pacientes com acidente vascular cerebral isquêmico

Pesquisador: Rodrigo Ribeiro Resende

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 15097113.3.0000.5149

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 281.754

Data da Relatoria: 22/05/2013

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo observacional, caso-controle, com uma casuística de 200 pacientes com acidente vascular cerebral isquêmico (AVCI) e 100 voluntários sem AVCI, participantes provenientes do Hospital Santa Casa de Misericórdia de BH, com idade entre 25 e 85 anos. Todos os participantes serão submetidos à coleta de sangue. Serão feitas análises do perfil metabólico (metaboloma) e de expressão gênica, usando material biológico (sangue e derivados). Será realizada a detecção de metabólitos (aminoácidos e ácidos graxos) no plasma de pacientes com AVCI, mediante a técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Depois, será feita a análise da expressão de genes relacionados com as vias de inflamação, usando leucócitos isolados do sangue periférico de pacientes com AVCI pela técnica de PCR. Há critérios de inclusão e de exclusão, resumo do tratamento estatístico, cronograma com data de "recrutamento dos pacientes" a partir de 01/05/13 e custo de dezessete mil reais, com financiamento próprio. As análises de perfil metabólico serão realizadas no Departamento de Química (UFMG); e as análises de expressão gênica serão realizadas no laboratório de Sinalização Celular e Nanotecnologia (UFMG).

Objetivo da Pesquisa:

"Objetivo Primário: - Pesquisar, identificar e caracterizar os perfis metabólitos e genéticos de

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad S/C 2005

Bairro: Unidade Administrativa II

CEP: 31.270-901

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

Continuação do Parecer: 281.754

pacientes com AVCI em busca de novos biomarcadores que possam contribuir efetivamente para o diagnóstico da doença.

Objetivo Secundário: - Busca e seleção, com base na literatura, de metabólitos representativos de vias de sinalização envolvidas com o dano celular (endotélio, micróglia, neurônios e astrócitos) e inflamação, que serão usados na padronização da técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas; - Padronização das condições de análise, identificação e quantificação de aminoácidos, ácidos graxos, ácidos biliares e carboidratos presentes no soro de pacientes com AVCI usando GC-MS; - Realizar a análise da expressão gênica em amostras de sangue periférico de pacientes com AVCI, identificando genes diferentemente expressos nos subtipos da doença; - Estabelecer e correlacionar os perfis de expressão gênica com os perfis dos metabólitos encontrados nas amostras analisadas; - Investigar o potencial dos metabólitos e genes em diferenciar os subtipos de AVCI; - Investigar a correlação dos genes e metabólitos encontrados com as principais vias de sinalização celular envolvidas com a doença, como por exemplo, vias de inflamação".

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo os pesquisadores "este estudo envolve coleta de dados de história clínica, exame físico e coleta de sangue venoso, sendo os riscos apenas os inerentes a este procedimento". Entretanto, não foram descritos os riscos no projeto. E segundo os pesquisadores não há benefícios.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Segundo os pesquisadores, "atualmente nenhum teste sanguíneo para AVCI é usado na prática clínica". A identificação de biomarcadores, objetivo principal do projeto, pode nortear a abordagem daqueles pacientes, com vistas à melhora de seu prognóstico.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Anexados projeto de pesquisa (também em documento word), termos de compromissos de todos os pesquisadores, parecer substanciado do Departamento de Imunologia e Bioquímica, TCLE e folha de rosto. Não há cartas de anuência dos laboratórios, nos quais serão feitas as análises de perfil metabólico e de expressão gênica. Não há carta de anuência do Hospital Santa Casa. O TCLE está em forma de convite, porém é colocado que "Este estudo foi rigorosamente avaliado por um comitê de ética em pesquisa que o aprovou, indicando que neste estudo não apresenta riscos para sua saúde". Não são colocados os riscos da coleta de 20 ml de sangue e não há benefícios. Há somente um TCLE para o paciente ou seu representante legal, porém com texto dirigido ao paciente. Não há dados para contato com os pesquisadores e não há dados do COEP (endereço,

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II

CEP: 31.270-901

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

Continuação do Parecer: 281.754

telefone) para os aspectos éticos.

Recomendações:

Anexar as cartas de anuências dos laboratórios envolvidos para realização das análises de perfil metabólico e de expressão gênica. Anexar carta de anuência da Instituição onde serão convidados os pacientes (Santa Casa de BH). Adequar o texto do TCLE, incluindo riscos e benefício, dados de contato dos pesquisadores e do COEP. Deve ser confeccionado outro TCLE dirigido ao responsável para pacientes incapazes de entendimento ou de assinar o termo devido às sequelas do AVCI. Deve ser confeccionado um TCLE com texto adequado para os voluntários que nunca apresentaram AVCI. Adequar o cronograma da pesquisa, pois o convite aos participantes somente pode ser iniciado após sua aprovação pelo COEP.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto está em diligência para as providências relacionadas acima.

Situação do Parecer:

Pendente

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O COEP aguarda a resposta até 60 (sessenta) dias a partir da entrega deste parecer. Ao final deste prazo, o projeto será arquivado. Solicita-se, ainda, que as respostas sejam enviadas de forma ordenada, conforme os itens das considerações deste parecer, indicando-se, também, a localização das possíveis alterações no protocolo, inclusive no TCLE.

BELO HORIZONTE, 23 de Maio de 2013

Assinador por:
Maria Teresa Marques Amaral
(Coordenador)

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005
Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901
UF: MG Município: BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3409-4592 E-mail: coep@prpq.ufmg.br

Anexo B - Parecer Consubstanciado do CEP da SCMBH

SANTA CASA DE
MISERICÓRDIA DE BELO
HORIZONTE - SCMBH



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise do perfil metabólico e de expressão gênica em amostras de pacientes com acidente vascular cerebral isquêmico

Pesquisador: Rodrigo Ribeiro Resende

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 15097113.3.0000.5149

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 315.034

Data da Relatoria: 29/06/2013

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo observacional, caso-controle, com uma casuística de 200 pacientes com acidente vascular cerebral isquêmico (AVCI) e 100 voluntários sem AVCI, participantes provenientes do Hospital Santa Casa de Misericórdia de BH, com idade entre 25 e 85 anos. Todos os participantes serão submetidos à coleta de sangue. Serão feitas análises do perfil metabólico (metaboloma) e de expressão gênica, usando material biológico (sangue e derivados). Será realizada a detecção de metabólitos (aminoácidos e ácidos graxos) no plasma de pacientes com AVCI, mediante a técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Depois, será feita a análise da expressão de genes relacionados com as vias de inflamação, usando leucócitos isolados do sangue periférico de pacientes com AVCI pela técnica de PCR. Há critérios de inclusão e de exclusão, resumo do tratamento estatístico, cronograma com data de

Endereço: Rua Domingos Vieira 590

Bairro: Santa Efigênia **CEP:** 30.150-240

UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3238-8933 **Fax:** (31)3238-8838 **E-mail:** cep@santacasabh.org.br

Continuação do Parecer: 315.034

"recrutamento dos pacientes" a partir de 01/05/13 e custo de dezessete mil reais, com financiamento próprio. As análises de perfil metabólico serão realizadas no Departamento de Química (UFMG); e as análises de expressão gênica serão realizadas no laboratório de Sinalização Celular e Nanotecnologia (UFMG).

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: - Pesquisar, identificar e caracterizar os perfis metabólitos e genéticos de pacientes com AVCI em busca de novos biomarcadores que possam contribuir efetivamente para o diagnóstico da doença.

Objetivo Secundário: - Busca e seleção, com base na literatura, de metabólitos representativos de vias de sinalização envolvidas com o dano celular (endotélio, micróglia, neurônios e astrócitos) e inflamação, que serão usados na padronização da técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas; - Padronização das condições de análise, identificação e quantificação de aminoácidos, ácidos graxos, ácidos biliares e carboidratos presentes no soro de pacientes com AVCI usando GC-MS; - Realizar a análise da expressão gênica em amostras de sangue periférico de pacientes com AVCI, identificando genes diferentemente expressos nos subtipos da doença; - Estabelecer e correlacionar os perfis de expressão gênica com os perfis dos metabólitos encontrados nas amostras analisadas; - Investigar o potencial dos metabólitos e genes em diferenciar os subtipos de AVCI; - Investigar a correlação dos genes e metabólitos encontrados com as principais vias de sinalização celular envolvidas com a doença, como por exemplo, vias de inflamação".

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo os pesquisadores "este estudo envolve coleta de dados de história clínica, exame físico e

Endereço: Rua Domingos Vieira 500
Bairro: Santa Efigênia CEP: 30.150-240
UF: MG Município: BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3238-8933 Fax: (31)3238-8838 E-mail: cep@santacasabh.org.br

SANTA CASA DE
MISERICÓRDIA DE BELO
HORIZONTE - SCMBH



Continuação do Parecer: 315.034

coleta

de sangue venoso, sendo os riscos apenas os inerentes a este procedimento". Entretanto, não foram descritos os riscos no projeto. E segundo os pesquisadores não há benefícios.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Segundo os pesquisadores, "atualmente nenhum teste sanguíneo para AVCI é usado na prática clínica". A identificação de biomarcadores, objetivo principal do projeto, pode nortear a abordagem daqueles pacientes, com vistas à melhora de seu prognóstico.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A 1ª versão foi considerados os seguintes termos:

Anexados projeto de pesquisa (também em documento word), termos de compromissos de todos os pesquisadores, parecer consubstanciado do Departamento de Imunologia e Bioquímica, TCLE e folha de rosto. Não há cartas de anuência dos laboratórios, nos quais serão feitas as análises de perfil metabólico e de expressão gênica. Não há carta de anuência do Hospital Santa Casa. O TCLE está em forma de convite, porém é colocado que "Este estudo foi rigorosamente avaliado por um comitê de ética em pesquisa que o aprovou, indicando que neste estudo não apresenta riscos para sua saúde". Não são colocados os riscos da coleta de 20 ml de sangue e não há benefícios. Há somente um TCLE para o paciente ou seu representante legal, porém com texto dirigido ao paciente. Não há dados para contato com os pesquisadores e não há dados do COEP (endereço, telefone) para os aspectos éticos.

Recomendações:

Normas atendidas de acordo com a instituição proponente.

Endereço: Rua Domingos Vieira 500
Bairro: Santa Efigênia CEP: 30.150-240
UF: MG Município: BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3238-8933 Fax: (31)3238-8838 E-mail: cep@santacasabh.org.br

SANTA CASA DE
MISERICÓRDIA DE BELO
HORIZONTE - SCMBH



Continuação do Parecer: 315.034

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

BELO HORIZONTE, 25 de Junho de 2013

Assinador por:
Francisco das Chagas Lima e Silva
(Coordenador)

Endereço: Rua Domingos Vieira 590
Bairro: Santa Efigênia **CEP:** 30.150-240
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3238-8933 **Fax:** (31)3238-8838 **E-mail:** cep@santacasabh.org.br