

ALINE VASCONCELLOS MARTINS VAZ

**AVALIAÇÃO DO PERFIL OXIDATIVO E INFLAMATÓRIO DE
PACIENTES COM ENXAQUECA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2019

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

V393a Vaz, Aline Vasconcellos Martins, 1976-
2019 Avaliação do perfil oxidativo e inflamatório de pacientes
com enxaqueca / Aline Vasconcellos Martins Vaz. – Viçosa,
MG, 2019.

ix, 34 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Texto em português e inglês.

Inclui anexos.

Orientador: Lucas Vilas Bôas Magalhães.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Enxaqueca. 2. Stress oxidativo. 3. Neutrófilos.
4. Linfócitos. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento
de Medicina e Enfermagem. Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde. II. Título.


CDD 22. ed. 616.84912

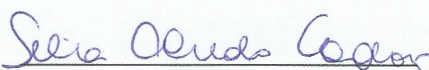
ALINE VASCONCELLOS MARTINS VAZ

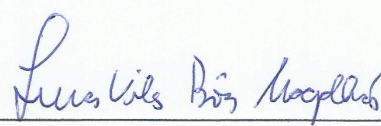
**AVALIAÇÃO DO PERFIL OXIDATIVO E INFLAMATÓRIO DE
PACIENTES COM ENXAQUECA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 17 de junho de 2019.


Leandro Licursi de Oliveira


Silvia Almeida Cardoso


Lucas Vilas Bôas Magalhães
(Orientador)

Ao meu esposo Rodrigo, meu grande amor, por seu otimismo contagiante e sua alegria de viver. Você, que é sempre o meu maior incentivador, foi fundamental para que eu conseguisse concretizar este projeto.

AGRADECIMENTOS

Ao meu filho, Fernando Augusto, por compreender, com tanta doçura, a minha ausência em casa e as horas de estudo em detrimento de sua companhia.

Ao meu orientador, Lucas Vilas Bôas, pela confiança.

À professora Silvia Almeida Cardoso, pela disponibilidade, leveza do convívio e parceria. Minha admiração e respeito pelo seu trabalho e gratidão por todo apoio.

A Rodrigo de Barros Freitas por todo o suporte e auxílio em diversas etapas.

Ao professor Leandro Licursi de Oliveira, pela oportunidade de trabalho e pelo contato com sua equipe maravilhosa.

Aos alunos do curso de medicina Gabriella Carlos, Breno Starling e Ibsen Passos por sua importante cooperação.

Ao professor Eduardo de Almeida Marques da Silva por aceitar compor a banca de avaliação da dissertação.

Ao meu sogro, Nelson Vaz e sua esposa Claudia Rocha, por suas valiosas contribuições.

A minha ex-chefe na DSA, Nathália Dias Pereira Alves Oliveira, pelo incentivo e nova oportunidade de trabalho e crescimento profissional.

Às funcionárias da Pós-graduação, Elizângela e Leila, pelo profissionalismo e gentileza.

Ao Laboratório de Análises Clínicas da Divisão de Saúde, nas figuras de Marcos Rodrigo de Oliveira e Wilton Bhering de Ramos.

Aos pacientes que participaram do projeto.

E a todos que contribuíram de alguma maneira.

RESUMO

MARTINS VAZ, Aline Vasconcellos. Universidade Federal de Viçosa, junho de 2019. **Avaliação do perfil oxidativo e inflamatório de pacientes com enxaqueca.** Orientador: Lucas Vilas Bôas Magalhães. Coorientadores: Silvia Almeida Cardoso e Rodrigo de Barros Freitas.

A enxaqueca é um dos tipos mais comuns de cefaleia primária. Há vários estudos evidenciando que os processos inflamatórios e o estresse oxidativo estão envolvidos na patogênese da enxaqueca. No entanto, é necessário maior conhecimento sobre essa questão, porque os dados são, em parte, controversos, e os possíveis mecanismos subjacentes permanecem inconclusivos. Para avaliar e comparar o perfil oxidativo e inflamatório de pacientes com enxaqueca, 47 voluntários foram divididos em três grupos, sendo: 15 mulheres com enxaqueca crônica (MEC), 17 mulheres com enxaqueca episódica (MEE) e 15 homens com enxaqueca (HE). Nos pacientes com enxaqueca, na fase interictal, foram determinados: capacidade antioxidante total; atividade enzimática dos agentes antioxidantes catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST) e superóxido dismutase (SOD); marcadores de estresse oxidativo malondialdeído (MDA) e proteínas carboniladas; hemograma e razão neutrófilo/linfócito; e ácido úrico, proteína c-reativa e colesterol total e frações. O grupo composto exclusivamente por participantes do sexo masculino apresentou redução da capacidade antioxidante total, assim como menor detecção das enzimas antioxidantes, entretanto não apresentou alteração significativa dos marcadores de dano relacionados ao estresse oxidativo, diferentemente do que ocorreu com os grupos compostos por mulheres. Esses resultados indicam que há diferença no perfil oxidativo entre os sexos, em pacientes com enxaqueca. Este estudo pode contribuir para a melhor compreensão do perfil dos pacientes, com o estabelecimento de diferentes fenótipos de enxaqueca, e para identificar novos marcadores que possam ajudar na compreensão da fisiopatologia e no manejo dos portadores de enxaqueca, visto que o perfil oxidativo apresentou diferenças significativas entre os grupos de homens e mulheres avaliados.

ABSTRACT

MARTINS VAZ, Aline Vasconcellos, Universidade Federal de Viçosa, June, 2019.
Evaluation of the oxidative and inflammatory profile of patients with migraine.
Adviser: Lucas Vilas Bôas Magalhães. Co-advisers: Silvia Almeida Cardoso and Rodrigo de Barros Freitas.

Among one of the most commonly seen and primary headaches is migraine. Oxidative stress and inflammation is discussed to be implicated in the pathogenesis of migraine. However, further knowledge about this issue is necessary because data are in part controversial and the possible underlying mechanisms remain inconclusive to date. To evaluate and compare the oxidative and inflammatory profile of patients with migraine 47 volunteers were divided into 3 groups: 15 women with chronic migraine (WCM); 17 women with episodic migraine (WEM) and 15 men with migraine (MM) and enrolled in this study. Total antioxidant status; the enzymatic activity of the antioxidant agents Catalase (CAT), Glutathione S-transferase (GST) and Superoxide Dismutase (SOD); oxidative stress markers malondialdehyde (MDA) and carbonylated proteins; blood count and neutrophil/lymphocyte ratio; uric acid, c-reactive protein and cholesterol total and fractions were determined in patients with migraine in the interictal phase. The group male participants (MM) displayed a reduction in total antioxidant status, as well as a lower value for antioxidant enzymes, but had no significant alterations in markers related to damage by oxidative stress compared to women. These findings suggest that there is a difference in the oxidative profile between the sexes among migraine patients. This may allow a better understanding of patients profile with different migraine phenotypes and identify new markers that might help understanding the pathophysiology and migraine patient management.

LISTA DE ABREVIATURAS

CAT	Catalase
GST	Glutathiona-S Transferase
HE	Homens com Enxaqueca
MDA	Malondialdeído
MEC	Mulheres com enxaqueca Crônica
MEE	Mulheres com Enxaqueca Episódica
PCR	Proteína-c Reativa
SOD	Superóxido Dismutase
UFV	Universidade Federal de Viçosa

LISTA DE TABELAS

	Página
Table 1 – Socio-demographic characteristics of the volunteers (N = 47).....	13
Table 2 – Hematological analysis of the studied groups (n = 47).....	13

LISTAS DE FIGURAS

Página

Fig. 1 – Total antioxidant status (TAS) in the serum of women with chronic migraine. WCM (n = 15), women with episodic migraine; WEM (n = 17) and men with migraine; and MM (n = 15).....	14
Fig. 2 – Quantification of serum uric acid in patients with migraine. Serum uric acid values in women with chronic migraine. WCM (n = 15), women with episodic migraine; WEM (n = 17); and men with migraine MM (n = 15). ** p ≤ 0.01 One-way ANOVA.	15
Fig. 3 – Detection of serum enzymatic activity. Evaluation of Catalase (A), Glutathione S-transferase (B) and Superoxide dismutase (C) in serum of women with chronic migraine. WCM (n = 15), women with episodic migraine; WEM (n = 17) and men with migraine; and MM (n = 15). p ≤ 0.05, ** p ≤ 0.01, **** p ≤ 0.001 One-way ANOVA.....	15
Fig. 4 – Quantification of markers of tissue damage. Lipid oxidation evaluation determined by MDA (A) and carbonylated proteins (B) in women with chronic migraine. WCM (n = 15), women with episodic migraine; WEM (n = 17) and men with migraine; and MM (n = 15).....	16
Fig. 5 – Spearman dispersion and correlation (r). Correlation between total antioxidant status (TAS) and serum lipid peroxidation (MDA) in women with chronic migraine. WCM (n = 15), women with episodic migraine; WEM (n = 17) and men with migraine; and MM (n = 15).....	16
Fig. 6 – Spearman dispersion and correlation (r). Relationship between total antioxidant capacity (FRAP) and serum carbonylated proteins in chronic demyelination (A), women with episodic migraine (B) and men with migraine (C).	17

SUMÁRIO

	Página
1 APRESENTAÇÃO	1
2 INTRODUÇÃO GERAL	2
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	5
4 OBJETIVOS	7
4.1 Objetivo geral.....	7
4.1.1 Objetivos específicos	7
5 PRODUTO FINAL.....	8
6 CONCLUSÕES GERAIS.....	24
ANEXO A – Critérios de diagnóstico de enxaqueca sem aura (ICHD-3)	25
ANEXO B – Critérios de diagnóstico de enxaqueca com aura (ICHD-3)	26
ANEXO C – Critérios de diagnóstico de enxaqueca crônica (ICHD-3)	27
ANEXO D – Parecer consubstanciado do CEP	28
ANEXO E – Comprovante de submissão do artigo.....	33

1 APRESENTAÇÃO

A presente dissertação foi elaborada de acordo com as normas estabelecidas pela Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Federal de Viçosa (PPG-UFV), Viçosa, Minas Gerais. O corpo do trabalho compreende a introdução geral, os objetivos geral e específicos, um artigo científico e a conclusão geral. O artigo intitulado “**Avaliação do perfil oxidativo e inflamatório de pacientes com enxaqueca**” foi formatado de acordo com as normas da revista Cellular and Molecular Neurobiology (Qualis B1 – Medicina 1), para a qual ele foi submetido.

2 INTRODUÇÃO GERAL

A cefaleia pode ser considerada uma das desordens neurológicas mais prevalentes na atualidade, sendo raro encontrar alguém que não tenha sentido dor de cabeça pelo menos uma vez na vida (FERNÁNDEZ-DE-LAS-PEÑAS et al. 2014). Apresenta-se também como uma das 12 queixas mais comuns nos serviços de atenção primária (STEINER et al. 2018).

A enxaqueca, também denominada migrânea, é um dos tipos mais comuns de cefaleia (STOVNER et al. 2007), e estima-se que ela acometa de 15 a 18% da população global (SILBERSTEIN et al. 2017). Em virtude da alta prevalência, a migrânea apresenta grande impacto negativo, tanto em nível socioeconômico, quanto em nível pessoal, sendo uma importante causa de absenteísmo ao trabalho e de comprometimento da qualidade de vida (ABU BAKAR et al. 2016). Trata-se da terceira condição clínica mais prevalente e a sétima causa específica de incapacidade no mundo (VOS et al. 2015).

A migrânea é classificada como uma cefaleia primária, e tem dois subtipos principais: sem aura e com aura. A enxaqueca sem aura caracteriza-se por uma síndrome clínica composta por cefaleia recorrente, com episódios de duração de 4 a 72 horas. Essa perturbação cefalálgica pode ter características específicas, como localização unilateral, intensidade moderada a grave, pulsatilidade, agravamento por atividade física de rotina e associação com náuseas, vômitos e/ou fotofobia e fonofobia (Anexo A) (OLESEN, 2013; DODICK 2018). Já a enxaqueca com aura é aquela acompanhada por sintomas neurológicos focais transitórios, que geralmente precedem e podem cessar ou não com o início da cefaleia (Anexo B) (OLESEN, 2013; DODICK 2018). Dados disponíveis sustentam o aumento do risco cardiovascular associado à enxaqueca com aura (SACCO et al. 2012).

A migrânea também pode ser classificada como episódica ou crônica, de acordo com o número de dias de acometimento ao mês. A enxaqueca é considerada crônica quando os episódios de cefaleia ocorrem em 15 dias ou mais por mês, durante um período superior a três meses, devendo ser ressaltado que em oito ou mais dias a dor apresenta características de enxaqueca, podendo ser com ou sem aura (Anexo C) (OLESEN, 2013; DODICK 2018). Portanto, indivíduos que têm cefaleia diária ou quase diária podem ter o diagnóstico de enxaqueca. Por outro lado, é definida como episódica quando se apresenta em menos de 15 dias ao mês, e

corresponde a cerca de 90% dos diagnósticos de enxaqueca (GOADSBY et al. 2017).

Segundo estudos epidemiológicos, a enxaqueca é uma desordem predominantemente feminina, ocorrendo três vezes mais em mulheres do que em homens (CHARLES, 2017; STEWART et al. 2008). A menarca, a menstruação, a gravidez, a menopausa e o uso de anticoncepcionais hormonais ou terapia de reposição hormonal podem influenciar a sua ocorrência. Essas observações, além do fato das crises comumente terem início após a menarca e decrescerem durante a gravidez e após a menopausa, reforçam a concepção de que os episódios de enxaqueca possam ser desencadeados por mudanças hormonais (STEWART et al. 2008; STEWART et al. 2013).

As crises de enxaqueca são mais comuns dois dias antes e três dias após o início do fluxo menstrual. Quando ocorre exclusivamente nesse período, pode ser classificada como enxaqueca menstrual pura, e quando ocorre adicionalmente em outros momentos do ciclo, recebe a denominação de enxaqueca relacionada com a menstruação (OLESEN, 2013). A cefaleia tende a ser mais severa, de maior duração, mais provável de ser associada com náuseas, não é acompanhada de aura e é menos responsiva ao tratamento do que a enxaqueca não associada à menstruação (SACCO et al. 2012; PIZZA et al. 2015).

Outros fatores também relacionados com o aparecimento das crises de enxaqueca (CHARLES, 2017): jejum, consumo exagerado de cafeína ou a privação dela, o estresse, a ingestão de alimentos ricos em nitratos ou glutamato, de queijos gordurosos, de chocolate e de vinho tinto, a privação do sono ou dormir em excesso (ODEGARD et al. 2010; ENGSTROM et al. 2013; OH et al. 2014; SONG et al. 2016).

Vários estudos têm sido conduzidos com o intuito de esclarecer a fisiopatologia envolvida na enxaqueca. A depressão cortical, a inflamação neurogênica e a disfunção na contratilidade vascular craniana parecem estar relacionadas à sua gênese (GOADSBY, 2012; NERI et al. 2015; BORKUM, 2015).

Além desses fatores, o estresse oxidativo tem sido associado a diversos tipos de cefaleia (CORDERO et al. 2012; NEYAL et al. 2013; VURUCU et al. 2013), inclusive com a enxaqueca (EREN et al. 2015).

Os radicais livres nocivos produzidos como resultado de processos metabólicos e fisiológicos são, normalmente, neutralizados por sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. O equilíbrio pode mudar para um

estado de estresse oxidativo, devido ao aumento da produção de radicais livres ou a uma deficiência nos mecanismos de defesa antioxidante (GEYIK et al. 2016). O estresse oxidativo pode danificar lipídios da membrana, ácidos nucleicos, proteínas e componentes da matriz extracelular, incluindo proteoglicanos e colágenos (RAJENDRAN et al. 2014).

O comprometimento do metabolismo oxidativo mitocondrial pode desempenhar um papel na fisiopatologia da enxaqueca. Além disso, há fortes evidências que associam a enxaqueca a uma variedade de transtornos comórbidos, incluindo doença cardiovascular e acidente vascular cerebral, nos quais o estresse oxidativo parece ser um importante mecanismo subjacente (PIZZA et al. 2015).

Se o estresse oxidativo e a inflamação podem representar eventos-chave na fisiopatologia da enxaqueca e alvos terapêuticos adequados, o maior conhecimento sobre essa questão pode contribuir para a compreensão da causa e das complicações da enxaqueca e pode ser essencial para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas.

Diante do exposto, justifica-se a importância da realização do presente estudo, fundamentado no conhecimento dos fatores associados à fisiopatologia relacionada com a enxaqueca, sobretudo no que tange ao perfil inflamatório e oxidativo desses pacientes, visando a um cuidado de forma mais particularizada, condizente com os diferentes perfis apresentados por essa doença.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU BAKAR, N.; TANPRAWATE, S.; LAMBRU, G. et al. Quality of life in primary headache disorders: a review. **Cephalalgia**, v. 36, n. 1, p. 67-91, 2016. <https://doi.org/10.1177/0333102415580099>.

BORKUM, J. M. Migraine triggers and oxidative stress: a narrative review and synthesis. **Headache**, v. 56, n. 1, p. 12-35, 2016. <https://doi.org/10.1111/head.12725>.

CORDERO, M. D.; CANO-GARCÍA, F. J.; ALCOCER-GÓMEZ, E. et al. Oxidative stress correlates with headache symptoms in fibromyalgia: Coenzyme Q10 Effect on clinical improvement. **PLoS One**, v. 7, n. 4, p. e35677, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035677>.

DODICK, D. W. Migraine. **The Lancet**, v. 31, n. 391, p. 1315-1330, 2018. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)30478-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)30478-1).

ENGSTROM, M.; HAGEN, K.; BJORK, M. et al. Sleep-related and non-sleep-related migraine: interictal sleep quality, arousals and pain thresholds. **The Journal of Headache and Pain**, v. 14, p. 68, 2013. DOI: 10.1186/1129-2377-14-68.

EREN, Y.; DIRIK, E.; NEŞELIOĞLU, S. et al. Oxidative stress and decreased thiol level in patients with migraine: cross-sectional study. **Acta Neurologica Belgica**, v. 115, n. 4, p. 643-649, 2015. <https://doi.org/10.1007/s13760-015-0427-y>.

FERNÁNDEZ-DE-LAS-PEÑAS, C.; PALACIOS-CEÑA, D.; SALOM-MORENO, J. et al. Has the prevalence of migraine changed over the last decade (2003–2012). A spanish population-based survey. **PLoS One**, v. 9, n. 10, p. e110530, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110530>.

GEYIK, S.; ALTUNISIK, E.; NEYAL, A. M. et al. Oxidative stress and DNA damage in patients with migraine. **The Journal of Headache and Pain**, v. 17, n. 10, 2016. <https://doi.org/10.1186/s10194-016-0606-0>.

GOADSBY, P. Pathophysiology of migraine. **Annals of Indian Academy of Neurology**, v. 15, p. 15, 2012. DOI: 10.4103/0972-2327.99993.

GOADSBY, P. J.; REUTER, U.; HALLSTRÖM, Y. et al. A Controlled Trial of Erenumab for Episodic Migraine. **The New England Journal of Medicine**, v. 377, p. 2123-2132, 2017. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1705848>.

NERI, M.; FRUSTACI, A.; MILIC, M. et al. A meta-analysis of biomarkers related to oxidative stress and nitric oxide pathway in migraine. **Cephalalgia**, v. 35, p. 931-937, 2015. <https://doi.org/10.1177/0333102414564888>.

NEYAL, M.; YIMENICIOGLU, F.; AYDENIZ, A. et al. Plasma nitrite levels, total antioxidant status, total oxidant status, and oxidative stress index in patients with tension-type headache and fibromyalgia. **Clinical Neurology & Neurosurgery**, v. 115, n. 6, p. 736-740, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2012.08.028>.

ODEGARD, S. S.; ENGSTROM, M.; SAND, T. et al. Associations between sleep disturbance and primary headaches: the third Nord-Trøndelag Health Study. **The Journal of Headache and Pain**, v. 11, p. 197-206, 2010. <https://doi.org/10.1007/s10194-010-0201-8>.

OH, K.; CHO, S.-J.; CHUNG, Y. K et al. Combination of anxiety and depression is associated with an increased headache frequency in migraineurs: a population-based study. **BMC Neurology**, v. 14, p. 238, 2014. <https://doi.org/10.1186/s12883-014>.

OLESEN, J. The international classification of headache disorders. 3rd edition. **Cephalgia**, v. 33, p. 629-808, 2013. DOI:10.1177/0333102413485658.

PIZZA, V.; CASSANO, D.; BUSILLO, V. et al. P073. Impaired oxidative balance in migraine: an open study. **The Journal of Headache and Pain**, v. 16, p. A115, 2015. <https://doi.org/10.1186/1129-2377-16-S1-A115>.

RAJENDRAN, P.; NANDAKUMAR, N.; RENGARAJAN, T. et al. Antioxidants and human diseases. **Clinica Chimica Acta**, v. 436, p. 332-347, Sept. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.06.004>.

SACCO, S.; RICCI, S.; DEGAN, D. et al. Migraine in women: the role of hormones and their impact on vascular diseases. **The Journal of Headache and Pain**, v. 13, p. 177-189, 2012. <https://doi.org/10.1007/s10194-012-0424-y>.

SILBERSTEIN, S. D.; DODICK, D. W.; BIGAL, M. E. et al. Fremanezumab for the preventive treatment of chronic migraine. **The New England Journal of Medicine**, v. 377, p. 2113-2122, 2017. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1709038>.

SONG, T.-J.; CHO, S.-J.; KIM, W.-J. et al. Anxiety and depression in probable migraine: A population-based study. **Cephalgia**, v. 37, p. 845-854, 2016. <https://doi.org/10.1177/0333102416653235>.

STEINER, T. J.; BUSE, D. C.; AL JUMAH, M. et al. The headache under-response to treatment (HURT) questionnaire, an outcome measure to guide follow-up in primary care: development, psychometric evaluation and assessment of utility. **The Journal of Headache and Pain**, v. 9, p. 15, 2018. <https://doi.org/10.1186/s10194-018-0842-6>.

STEWART, W. F.; WOOD, C.; REED, M. L. Cumulative lifetime migraine incidence in women and men. **Cephalgia**, v. 28, p. 1170-1178, Nov. 2008.

STEWART, W. F.; ROY, J.; LIPTON, R. B. Migraine prevalence, socioeconomic status, and social causation. **Neurology**, v. 81, n. 11, p. 948-955, 2013. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3182a43b32>.

STOVNER, L.; HAGEN, K.; JENSEN, R. et al. The global burden of headache: A documentation of headache prevalence and disability worldwide. **Cephalgia**, v. 27, p. 193-210, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1468-2982.2007.01288.x>.

VURUCU, S.; KARAOGLU, A.; PAKSU, M. et al. Relationship between oxidative stress and chronic daily headache in children. **Human & Experimental Toxicology**, v. 32, p. 113-119, 2013. <https://doi.org/10.1177/0960327112459204>.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar o perfil oxidativo e inflamatório de pacientes com enxaqueca atendidos em um serviço de saúde no município de Viçosa, Minas Gerais.

4.1.1 Objetivos específicos

- Categorizar os pacientes atendidos nos serviços de saúde.
- Levantar dados socioeconômicos/ambientais e clínicos dos pacientes, voluntários.
- Realizar avaliação bioquímica de cada participante (hemograma/leucograma e ácido úrico).
- Realizar avaliação sorológica do marcador inflamatório proteína-c reativa (PCR).
- Analisar as enzimas relacionadas com o estresse oxidativo: catalase (CAT), glutationa-S transferase (GST) e superóxido dismutase (SOD).
- Dosar marcadores de dano celular pelo estresse oxidativo (proteínas carboniladas e peroxidação lipídica).
- Correlacionar a capacidade antioxidante total com os marcadores de dano pelo estresse oxidativo.

5 PRODUTO FINAL

Artigo submetido para publicação em revista científica como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, para obtenção do título de *Magister Scientiae*, formatado conforme as normas da revista Cellular and Molecular Neurobiology, tendo sido editado como arquivo pdf pela referida revista.

Link acadêmico: Este artigo faz parte da dissertação de mestrado de Aline Vasconcellos Martins Vaz, do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Viçosa.

EVALUATION OF THE OXIDATIVE AND INFLAMMATORY PROFILE OF PATIENTS WITH MIGRAINE

1 Introduction

Headache can be considered as one of the most prevalent neurological disorders today, and it is rare to find someone free from a headache episode (Fernández-de-las-Peñas et al. 2014). Headaches are considered one of the 12 most common complaints in primary care services (Steiner et al. 2018).

Migraine is one of the most common types of headache (Stovner et al. 2007) and, due to its high prevalence, estimated in 15 to 18% of the global population, (Silberstein et al. 2017) it has a great negative socioeconomic impact, being an important cause of work absenteeism and impairment of quality of life (Abu Bakar et al., 2016). It is the third most prevalent clinical condition and the seventh specific cause of disability in the world (Vos et al. 2015).

Other factors are related to the onset of migraine attacks (Charles 2017). Omitting meals, excessive caffeine intake or deprivation of it, stress, ingesting foods rich in nitrates or glutamate, fatty cheeses, chocolate, red wine, sleep deprivation or excessive sleep are often identified as triggers of migraine (Odegard et al. 2010; Engstrom et al. 2013; Oh et al. 2014; Song et al. 2016).

Several studies have been conducted with the aim of clarifying the pathophysiology involved in migraine. Cortical depression, neurogenic inflammation, and dysfunction in cranial vascular contractility may be involved in its genesis (Goadsby 2012; Neri et al. 2015; Borkum 2016).

In addition to these factors, oxidative stress has been related to several types of headache (Vurucu et al. 2013; Cordero et al. 2012; Neyal et al. 2013), including with migraine (Eren et al. 2015).

Tissue damaging free radicals produced as a result of metabolic and physiological processes are normally neutralized by enzymatic and non-enzymatic antioxidant systems. The balance may become a state of oxidative stress due to either increased free radical production, or a deficiency in antioxidant defense mechanisms (Geyik et al. 2016). Oxidative stress can damage lipid membranes, nucleic acids, proteins and extracellular matrix components, including proteoglycans and collagens (Rajendran et al. 2014).

Alterations of mitochondrial oxidative metabolism may play a role in the pathophysiology of migraine. In addition, there is strong evidence linking migraine to a variety of comorbid disorders, including cardiovascular disease and stroke, in which oxidative stress appears to be an important underlying mechanism (Pizza et al. 2015).

If oxidative stress and inflammation indeed represent key events in the pathophysiology of migraine and, therefore, are appropriate therapeutic targets, further knowledge about this issue may contribute to the understanding of the cause and complications of migraine and may be essential for the development of new therapeutic approaches.

2 Materials and methods

2.1 Patient inclusion

Our cross-sectional study recruited individuals from an ambulatory of the Federal University of Viçosa, Minas Gerais, Brazil. The total number of patients attended in the period from July to November of 2018 with the diagnosis of migraine who fulfilled the International Classification of Headache Disorders (beta version - 2013) criteria was included in the study. The subjects, aged 18 to 61 years, were divided into three groups: (1) women with chronic migraine (WCM) n = 15; (2) women with episodic migraine (WEM) n = 17; and (3) men with migraine (episodic or chronic) (MM) n = 15. The study was approved by local ethics committee and all participants gave their written informed consent.

Exclusion criteria were: patients with comorbidities that interfere with the oxidative stress and the inflammatory profile (chronic diseases such as neoplasias, infections, collagenoses and other autoimmune diseases; other inflammatory processes, chronic renal insufficiency, chronic obstructive pulmonary disease, atherosclerotic vascular disease (coronary disease, stroke, peripheral artery disease), recent postoperative, allergies in activity, post-acute recent illness, recent post-hospitalization, pregnant women, and patients taking corticosteroids or immunosuppressants).

2.2 Collection of blood samples from patients

A blood sample was always obtained in the attack-free period between migraine attacks (interictal phase). Blood samples were centrifuged and the serum stored at -80 °C.

2.3 Biochemical analysis

Quantification of uric acid, C-reactive protein (CRP) and blood counts were performed using commercial kits following manufacturer's instructions (Labtest).

Blood counts were performed in an automated impedance counting system.

Concentration of blood proteins was performed according to Bradford (1976) using bovine serum albumin as standard.

Plasma TAS (total antioxidant status) was measured using fully automated colorimetric assay developed by Erel (2004) based on measurements of the OH radicals. Catalase (CAT) activity was assayed by measuring the rate of decrease of H₂O₂ absorbance at 240 nm (Aebi 1984). Estimation of serum glutathione-S-transferase (GST) was carried out as reported by Habig et al. (1974). Superoxide dismutase (SOD) activity was assayed by measuring the inhibition of adrenaline auto-oxidation, as described by Bannister and Calabrese (1987). As an index of lipid peroxidation, we used the formation of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) during an acid heating reaction (Draper and Hadley, 1990). Briefly, the samples were mixed with 1 ml of TCA 10% and 1 ml of thiobarbituric acid 0.67%, then heated in a boiling water bath for 15 min. TBARS were determined by the absorbance at 535 nm. All the results were normalized by the protein content (Lowry et al. 1951). The oxidative damage to proteins was assessed by the determination of carbonyl groups based on the reaction with dinitrophenylhydrazine (DNPH), as previously described (Levine et al. 1990). Briefly, proteins were precipitated by the addition of 20% trichloroacetic acid (TCA) and redissolved in DNPH and the absorbance read at 370 nm.

2.4 Statistical analysis

The analyzed variables displayed a normal distribution in the Shapiro-Wilk test, therefore, the One Way Anova parametric test was performed for multiple comparisons. The results were expressed as mean \pm standard deviation. Spearman's distribution and correlation was performed between total antioxidant status (TAS) and oxidative markers. Statistical significance was considered at $p < 0.05$. Analyses were performed using the GraphPad Prism 7.0 program (GraphPad Software, Inc. San Diego, CA, USA).

3 Results

In the present study, 47 volunteers were divided into 3 groups: 15 women with chronic migraine (WCM) with mean age of 36 years and 4 months \pm 9.6 years; 17

women with episodic migraine (WEM) with mean age of 25 years and 7 months \pm 6.5 years and 15 men with migraine (MM), with a mean age of 23 years and 8 months \pm 4.4 years. Other socio-demographic characteristics of the volunteers are summarized in Table 1.

Table 1 – Socio-demographic characteristics of the volunteers (N = 47)

Sex	Female		Male
Groups	WCM	WEM	MM
N	15	17	15
Mean age	36 years and 4 months (SD= \pm 9,6 years)	25 years and 7 months (SD = \pm 6,5 years)	23 years and 8 months (SD = \pm 4,4 years)
Race/color	White = 65,95%		
Schooling	Complete upper course = 46,81%		
Single/married	Single = 76,65%		
BMI (mean)	25,1 (SD = \pm 4,6)	22,9 (SD = \pm 3,7)	24,3(SD = \pm 3,5)

The majority of subjects self-declared to be of the white race, with complete superior course and singles. All declared to be non-smokers.

No significant difference was observed in the quantification of the blood cell types analyzed in blood count and leukogram between the three groups; there was no difference in the neutrophil/lymphocyte ratio (RN/L) (Table 2).

Table 2 – Hematological analysis of the studied groups (n = 47)

	WCM (n = 15)	WEM (n = 17)	MM (n = 15)
	mean \pm SD	mean \pm SD	mean \pm SD
Leukocytes (mm) - (10)	5,8 \pm 1,3	6,4 \pm 2,3	5,7 \pm 1,4
Lymphocytes (mm) - (10)	2,0 \pm 0,4	2,2 \pm 0,6	2,0 \pm 0,4
Neutrophils (mm) - (10)	3,2 \pm 1,0	3,8 \pm 1,7	3,3 \pm 1,0
Eosinophils (mm) - (10)	0,1 \pm 0,03	0,2 \pm 0,15	0,1 \pm 0,07

Monocytes (mm) - (10)	0,4 ± 0,08	0,4 ± 0,17	0,3 ± 0,08
RN/L	1,59	1,74	1,67

SD = standard deviation; RN/L = neutrophil/lymphocyte ratio.

No significant differences were detected in the quantification of the inflammatory marker PCR and on cholesterol, total and fractions, among the 3 groups (data not shown).

For the evaluation of the oxidative profile in the patients' serum, the total antioxidant status by iron reduction (TAS) was initially determined. It was verified that the group of men (MM) presented total antioxidant capacity significantly lower than the group of women with episodic migraine (WEM). Although the difference observed between the group of women with chronic migraine (WCM) and men (MM) was not significant, its value was close to statistical significance: $p = 0.0630$ (Fig. 1).

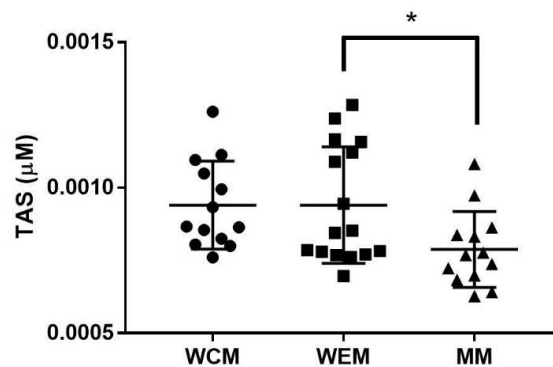


Fig. 1 – Total antioxidant status (TAS) in the serum of women with chronic migraine. WCM (n = 15), women with episodic migraine; WEM (n = 17) and men with migraine; and MM (n = 15).

Uric acid is an important antioxidant. The group of men had higher mean uric acid values than the groups composed by women, which was expected since the reference values for males are higher (Fig. 2).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

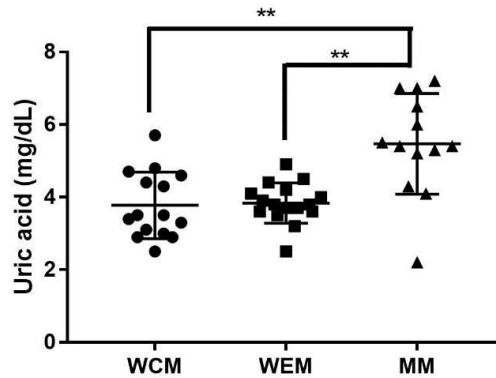


Fig. 2 – Quantification of serum uric acid in patients with migraine. Serum uric acid values in women with chronic migraine. WCM (n = 15), women with episodic migraine; WEM (n = 17); and men with migraine MM (n = 15). ** $p \leq 0.01$ One-way ANOVA.

Subsequently, the enzymatic activity of the antioxidant agents Catalase (CAT), Glutathione S-transferase (GST) and Superoxide Dismutase (SOD) were determined. The CAT and GST detections were significantly higher in the WCM group compared to the WEM and MM group (Fig. 3A and B). However, SOD detection was significantly increased in the two groups of women compared to the group of men (Fig. 3C).

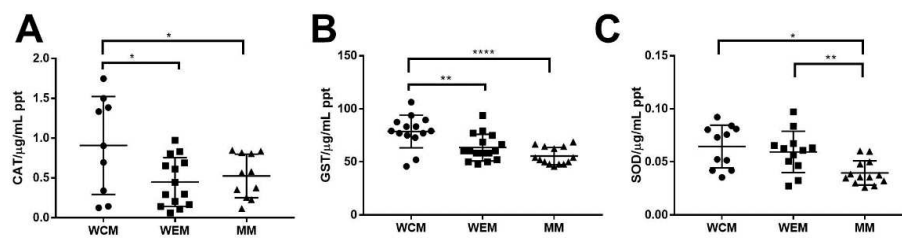


Fig. 3 – Detection of serum enzymatic activity. Evaluation of Catalase (A), Glutathione S-transferase (B) and Superoxide dismutase (C) in serum of women with chronic migraine. WCM (n = 15), women with episodic migraine; WEM (n = 17) and men with migraine; and MM (n = 15). $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, **** $p \leq 0.001$ One-way ANOVA.

To assess markers of tissue damage resulting from oxidative stress, the lipid peroxidation determined by MDA and the carbonylated proteins were quantified. The mean in the 3 groups show no significant statistical variation for MDA and carbonylated proteins (Fig. 4A and B).

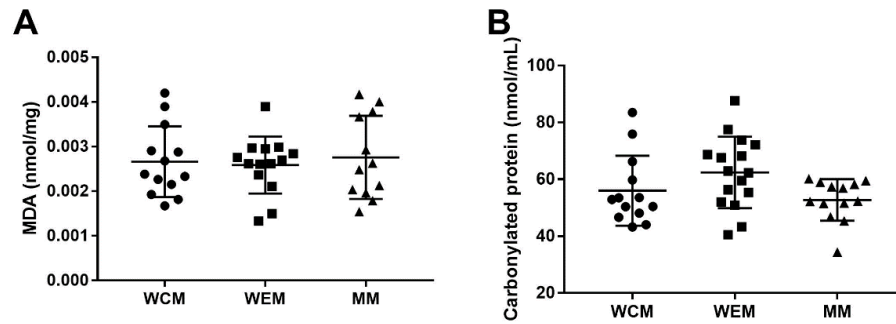


Fig. 4 – Quantification of markers of tissue damage. Lipid oxidation evaluation determined by MDA (A) and carbonylated proteins (B) in women with chronic migraine. WCM (n = 15), women with episodic migraine; WEM (n = 17) and men with migraine; and MM (n = 15).

We evaluated the correlation between migraine and the oxidative markers using the Spearman analysis. In the two groups composed of women, a significant inverse correlation was observed between measurements of serum total antioxidant status (TAS) and the marker of oxidative damage evidenced by lipid peroxidation determined by MDA (Fig. 5A and B), interestingly the same relation was not found observed for the male group (Fig. 5C).

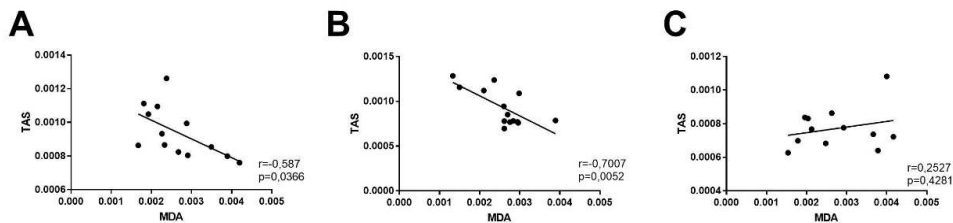


Fig. 5 – Spearman dispersion and correlation (r). Correlation between total antioxidant status (TAS) and serum lipid peroxidation (MDA) in women with

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

chronic migraine. WCM (n = 15), women with episodic migraine; WEM (n = 17) and men with migraine; and MM (n = 15).

Concerning the carbonylated proteins, only the group of women with episodic migraine (WEM) displayed a negative correlation with the total antioxidant status (TAS). (Fig. 6B)

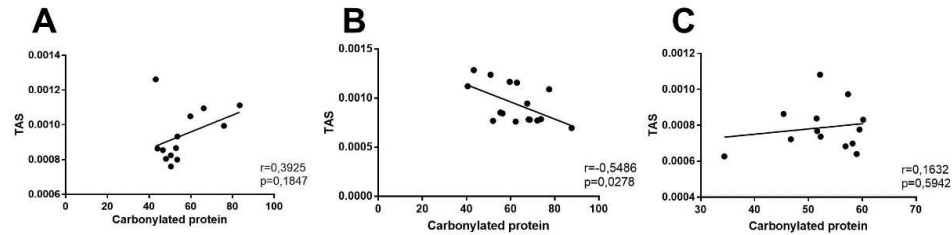


Fig. 6 – Spearman dispersion and correlation (r). Relationship between total antioxidant capacity (FRAP) and serum carbonylated proteins in chronic demyelination (A), women with episodic migraine (B) and men with migraine (C).

4 Discussion

Migraine is a frequent form of headache particularly in the third decade of life (Charles 2017). In spite of being considered a benign complaint (Yilmaz 2011), it results in frequent absence from work, significant consumption of medications and changes in the daily life and social activities of the patients (Abu Bakar et al. 2016; Dodick 2018).

Eryigit et al. (2017) reviewed several studies suggesting that inflammatory processes and oxidative stress are involved in the pathogenesis of migraine.

In order to identify new markers that might eventually help understanding the pathophysiology and migraine patient management, the present study investigated the inflammatory and oxidative profile of 47 volunteers, divided in 15 women with chronic migraine (WCM); 17 women with episodic migraine (WEM), and 15 men with migraine (MM). Most patients self-declared to be of the white race, with complete university degrees and not married.

Participants were selected in a University outpatient clinic, aimed at the care of the academic community, which justifies the predominant schooling, age and race/color, as well as allowing a reliable answers, since they understood well the clinical picture and the questions asked.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

No difference was observed in body mass index (BMI) values between the three groups studied, unlike Bahadir et al. who in 2013 found significantly lower BMI in the control (healthy) group than in the migraine group.

According to Costa et al. (2016), oxidative stress and inflammation are related to the genesis of migraine. Moskowitz and Cutrer (1993) suggested that migraine results from a neurogenic inflammatory reaction, and Turan et al. (2011) determined that markers of inflammation may rise during migraine attacks.

Several studies investigated the role of the neutrophil-lymphocyte ratio (N/L ratio) in the diagnosis and treatment of various diseases, including migraine (Gomez et al. 2008; Azab et al. 2012) as an important marker of inflammation (Demir 2015).

Karabulut et al.(2016) observed that N/L ration increases as a sign of inflammation during migraine attacks, differently from healthy controls. Eryigit et al. (2017), found no statistically significant differences between N/L ratio values in migraine and other groups with primary headache syndromes, similarly to the present results who compared 3 groups of migraine patients with different characteristics.

There was no significant differences between the groups in the red series, but there is an association between hematological disorders, such as anemia and headache, and anemia due to iron deficiency is an important factor related to migraine (Avijgan 2011; Pamuk et al. 2015).

Elevated levels of C-reactive protein (CRP) were observed in patients admitted with a migraine crisis, compared to healthy controls (Vanmolkot 2007; Gudmundsson et al. 2009), differently from observations of Ceylan et al. (2016), in which the levels were increased among those suffering from migraine as compared to controls. In our study, we found no significant differences in PCR values among the three groups analyzed.

In a study by Bahadir et al. (2013) total cholesterol (TC) levels were significantly higher in the group with migraine as compared to the control group without migraine. In the present study we did not observe significant variations in the values of cholesterol and fractions among the 3 groups analyzed.

It is known that patients with migraine have lower total antioxidant capacity (Vurucu et al. 2013).

It is already known that the sérum of migraine sufferers display a lower total antioxidant capacity (Vurucu et al. 2013; Yigit et al. 2018). In our study, the total

antioxidant status was determined by iron reduction (TAS) in the patients' serum. A lower TAS value was observed in the men group - MM (Fig. 1).

Uric acid is an important endogenous antioxidant agent, responsible for about 30% of the antioxidant action capacity in healthy individuals (Geyik et al. 2016). In the present study a significantly higher values were observed in the group of men (MM) compared to the two groups of women; however, no values were off the reference value for each sex (Fig. 2).

Other serum markers, such as the enzyme catalase (CAT), are predictors of antioxidant capacity (Alp et al. 2010). Aytaç et al. 2014 and Yigit et al. 2018, observed that CAT levels were significantly reduced in patients with migraine compared to healthy controls. In the present study, the group of women with chronic migraine (WCM) presented the highest values of the enzyme catalase (CAT) (Fig. 3A).

Glutathione S-transferases (GSTs) are a family of enzymes responsible for the metabolism of a wide range of xenobiotics and carcinogens (Mannervik 1985) and may represent the first step of a detoxification process leading to the formation of mercapturic acid. In addition, GSTs have a protective role in cells against oxidative stress products (Hayes and Strange 1995). Shukla (2018) showed that GST levels were significantly decreased in migraine patients compared to the control group. In our study, we showed that the group of women with chronic migraine (WCM) presented the highest values of glutathione S-transferase (GST), as well as that observed for the enzyme catalase (CAT) (Fig. 3 Ae B).

A high activity of the enzyme superoxide dismutase (SOD) correlates with better antioxidant power and this prevents oxidation-mediated damage (Ciancarelli et al. 2007). According to Borkum et al. (2016), lower SOD activity was found in erythrocytes and platelets in migraine sufferers, as well as a lower total antioxidant status, suggesting a greater vulnerability to oxidative stress (Ciancarelli et al. 2007). Gupta et al. (2009), reported lower levels of SOD in patients with migraine with aura than in patients without aura, suggesting that the migraine subtype may have an effect on the production of oxidants. In the present study, the two groups composed of women, both chronic and episodic migraine, presented higher values of the SOD enzyme in relation to men (Fig. 3 C).

Oxidative stress can modify membrane lipids, nucleic acids, proteins and extracellular matrix components, including proteoglycans and collagens (Geyik et al.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

2016). To evaluate lipid and protein oxidation and, consequently, oxidative damage to lipids and proteins, we measured the concentration of malondialdehyde (MDA) and carbonylated proteins in serum.

Previous studies found that plasma levels of MDA were significantly elevated in patients with migraine (Gupta et al. 2009; Aytac et al. 2014). Similar data were obtained by Yilmaz et al. (2011) and by Yigit et al. (2018) during migraine attacks. In the present study, in spite of variation in the activity of antioxidant enzymes between men and women, no difference was observed in the markers of damage as evidenced by MDA values.

Another marker of oxidative damage, such as the concentration of carbonylated proteins was not significantly different among the migraine subjects or healthy controls (Bernecker et al. 2011). In the present study, despite the variation in the activity of antioxidant enzymes between men and women, the mean in the 3 groups showed no significant statistical variation in carbonylated proteins.

In the current study, total antioxidant status (TAS) and damage by active forms of oxygen as measured by lipid peroxidation (MDA) were inversely correlated in groups composed exclusively of females. Likewise, protein carbonylation also showed a negative correlation with total serum antioxidant status, but in this case, only in the group of women with episodic migraine. These findings suggest that there is a difference in the oxidative profile between the sexes among migraine patients.

In summary, according to the present results, we conclude that the group male participants (MM) displayed a reduction in total antioxidant status, as well as a lower value for antioxidant enzymes, but had no significant alterations in markers related to damage by oxidative stress compared to women. This may allow a better understanding of patients profile with different migraine phenotypes and identify new markers that might help understanding the pathophysiology and migraine patient management.

5 Compliance with Ethical Standards

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval: All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional research committee - CEP/UFV (n° 2.706.366) and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

Informed consent: Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

6 References

- Abu Bakar N, Tanprawate S, Lambru G et al. (2016) Quality of life in primary headache disorders: a review. *Cephalalgia* 36(1):67-91. <https://doi.org/10.1177/0333102415580099>.
- Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105:121-126. doi:10.1016/S0076-6879(84)05016-3.
- Alp R, Selek S, Alp SI et al (2010) Oxidative and antioxidative balance in patients of migraine. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 14(10):877-882.
- Avijgan M (2011) Migraine Headache and Iron Deficiency Anemia. *Nursing Faculty Journal of Iranian University of Medical Sciences*. 23:37-43.
- Aytaç B, Coşkun Ö, Alioğlu B et al. (2014) Decreased antioxidant status in migraine patients with brain white matter hyperintensities. *Neurol Sci*. 35(12):1925-1929.
- Azab B, Bhatt VR, Phookan J et al. (2012) Use-fulness of the neutrophil-to-lymphocyte ratio in predicting short- and long- term mortality in breast cancer patients, *Ann. Surg. Oncol*. 19(1):217-224.
- Bahadir A, Eroz R, Dikici S (2013) Investigation of MTHFR C677T Gene Polymorphism, Biochemical and Clinical Parameters in Turkish Migraine Patients: Association with Allodynia and Fatigue. *Cell Mol Neurobiol*. 33(8): 1055-1563. <https://doi.org/10.1007/s10571-013-9972-1>.
- Bannister JV, Calabrese L (1987) Assays for SOD. *Methods Biochem Anal* 32:279–312. doi:10.1002/9780470110539.ch5.
- Bernecker, C, Ragginer, C, Fauler, G et al. (2011). Oxidative stress is associated with migraine and migraine-related metabolic risk in females. *European journal of neurology : the official journal of the European Federation of Neurological Societies*. 18. 1233-9. 10.1111/j.1468-1331.2011.03414.x.
- Borkum JM (2016) Migraine triggers and oxidative stress: a narrative review and synthesis. *Headache* 56(1):12-35. <https://doi.org/10.1111/head.12725>.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive methods for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal. Biochem*. 72:248-254.
- Ceylan M, Bayraktutan OF, Becel S et al. (2016) Serum levels of pentraxin-3 and other inflammatory biomarkers in migraine: association with migraine characteristics. *Cephalalgia* 36(6):518-525. <https://doi.org/10.1177/0333102415598757>.
- CHARLES, A. Migraine (1070) *The New England Journal of Medicine* 10:377:553-561. <https://doi.org/10.1056/NEJMcp1605502>.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
- Ciancarelli I, Tozzi-Ciancarelli MG, Spacca G et al. (2007) Relationship between biofeedback and oxidative stress in patients with chronic migraine. *Cephalalgia* 27:1136-1141.
- Cordero MD, Cano-García FJ, Alcocer-Gómez E et al. (2012) Oxidative Stress Correlates with Headache Symptoms in Fibromyalgia: Coenzyme Q10 Effect on Clinical Improvement. *PLoS One* 7:e35677. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035677>.
- Costa SC, Passos IC, Réus GZ et al (2016) The Comorbidity of bipolar disorder and migraine: the role of inflammation and oxidative and nitrosative stress. *Curr. Mol. Med.* 16(2):179-86.
- Dodick DW (2018) Migraine. *The Lancet.* 31:391:1315-1330. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)30478-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)30478-1).
- Draper HH, Hadley M (1990) Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 186:421-431. doi:10.1016/0076-6879(90)86135-I.
- ENGSTROM, M.; HAGEN, K.; BJORK, M. et al. (2013) Sleep-related and non-sleep-related migraine: interictal sleep quality, arousals and pain thresholds. *J Head and Pain* 14:68, 2013. doi: 10.1186/1129-2377-14-68.
- Erel O. (2004) A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clin Biochem.* 37(2):112-119.
- Eryigit U, Altunayoglu Cakmak V, Sahin A et al. (2017) The diagnostic value of the neutrophil-lymphocyte ratio in distinguishing between subarachnoid hemorrhage and migraine. *Am J Emerg Med.* 35(9):1276-1280. <https://doi.org/10.1016/j.ajem.2017.03.063>.
- Fernández-de-las-Peñas C, Palacios-Ceña D, Salom-Moreno J et al (2014) Has the Prevalence of Migraine Changed over the Last Decade (2003-2012) A Spanish Population-Based Survey. *PLoS One* 9:e110530. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110530>.
- Geyik S, Altunisik E, Neyal AM et al (2016) Oxidative stress and DNA damage in patients with migraine. *J Headache Pain* 17:10. <https://doi.org/10.1186/s10194-016-0606-0>.
- Goadsby P (2012) Pathophysiology of migraine. *Ann Indian Acad Neurol.* 15:15. <https://doi.org/10.4103/0972-2327.99993>.
- Gomez D, Farid S, Malik H.Z et al. (2008) Preoperative neutrophil-to-lymphocyte ratio as a prognostic predictor after curative resection for hepatocellular carcinoma. *World J. Surg.* 32(8):1757-1762.
- Gudmundsson LS, Aspelund T, Scher AI et al. (2009) C-reactive protein in migraine sufferers similar to that of non-migraineurs: the Reykjavik Study. *Cephalalgia* 29(12):1301-1310.
- Gupta R, Pathak R, Bhatia MS et al. (2009) Comparison of oxidative stress among migraineurs, tension-type headache subjects, and a control group. *Ann Indian Acad Neurol.* 12(3):167-172.
- Habig WH; Pabst MJ; Jackoby WB (1974) Glutathione-s-transferease. The first enzymatic step in mercapturic acid formation *J. Biol Chem.* 249:7130-7139.

1 Hayes JD, Strange RC (1995) Potential contribution of the glutathione S-transferase
2 supergene family to resistance to oxidative stress. *Free Radic Res* 22:193-207.

3 Karabulut KU, Egercioglu TU, Uyar M et al. (2016) The change of
4 neutrophils/lymphocytes ratio in migraine at- tacks: a case-controlled study. *Ann*
5 *Med Surg. (Lond)*10:52–56. <https://doi.org/10.1016/j.amsu.2016.07.023>

6
7 Levine RL, Garland D, Oliver CN et al. (1990) Determination of carbonyl content in
8 oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 186:464-478. doi:10.1016/0076-
9 6879(90)86141-H.

10
11 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with
12 the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.

13
14 Mannervik B (1985) The isozymes of glutathione transferase. *Adv Enzymol Relat*
15 *Areas Mol Biol.* 57:357-417.

16
17 Moskowitz MA, Cutrer FM (1993) Sumatriptan: a receptor-targeted for migraine.
18 *Annu. Rev. Med.* 44:145-154.

19
20 Neri M, Frustaci A, Milic M et al (2015) A meta-analysis of biomarkers related to
21 oxidative stress and nitric oxide pathway in migraine. *Cephalalgia* 35:931937.
22 <https://doi.org/10.1177/0333102414564888>.

23
24 Neyal M, Yimenicioglu F, Aydeniz A et al (2013) Plasma nitrite levels, total
25 antioxidant status, total oxidant status, and oxidative stress index in patients with
26 tension-type headache and fibromyalgia. *Clin Neuroleurosurg.* 115(6):736-740.
27 <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2012.08.028>.

28
29 Odegard SS, Engstrom M, Sand T, Stovner LJ et al. (2010) Associations between
30 sleep disturbance and primary headaches: the third Nord-Trøndelag Health Study. *J*
31 *Headache Pain* 11:197-206. <https://doi.org/10.1007/s10194-010-0201-8>.

32
33 Oh K, Cho S-J, Chung YK et al (2014) Combination of anxiety and depression is
34 associated with an increased headache frequency in migraineurs: a population-based
35 study. *BMC Neurol.* 14:238. <https://doi.org/10.1186/s12883-014-0238-4>.

36
37 Pamuk GE, Top MŞ, Uyanik MŞ et al (2015) Is iron-deficiency anemia associated
38 with migraine? Is there a role for anxiety and depression? Wien Klin
39 Wochenschr. 128(8):576-580. <https://doi.org/10.1007/s00508-015-0740-8>.

40
41 Pizza V, Cassano D, Busillo V et al (2015) P073. Impaired oxidative balance in
42 migraine: an open study. *J Headache Pain* 16:A115. [https://doi.org/10.1186/1129-](https://doi.org/10.1186/1129-2377-16-S1-A115)
43 [2377-16-S1-A115](https://doi.org/10.1186/1129-2377-16-S1-A115).

44
45 Rajendran P, Nandakumar N, Rengarajan T et al (2014) Antioxidants and human
46 diseases. *Clin Chim Acta* 436:332-347. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.06.004>.

47
48 Silberstein SD, Dodick DW, Bigal ME et al. (2017) Fremanezumab for the
49 Preventive Treatment of Chronic Migraine. *N Engl J Med* 377:2113-22. DOI:
50 10.1056/NEJMoa1709038.

51
52 SONG, T.-J.; CHO. S.-J.; KIM, W.-J. et al. (2016) Anxiety and depression in
53 probable migraine: A population-based study. *Cephalalgia* 37:845-854. [https://doi.](https://doi.org/10.1177/0333102416653235)
54 [org/10.1177/0333102416653235](https://doi.org/10.1177/0333102416653235).

55
56 Steiner TJ, Buse DC, Al Jumah M et al. (2018) The headache under-response to
57 treatment (HURT) questionnaire, an outcome measure to guide follow-up in primary
58
59
60
61
62
63
64
65

care: development, psychometric evaluation and assessment of utility. *J Headache Pain* 19:15. <https://doi.org/10.1186/s10194-018-0842-6>.

Stovner L, Hagen K, Jensen R et al. (2007) The Global Burden of Headache: A Documentation of Headache Prevalence and Disability Worldwide. *Cephalalgia* 27:193-210. <https://doi.org/10.1111/j.1468-2982.2007.01288.x>.

Turan H, Horasanli B, Ugur M et al. (2011) Procalcitonin levels in migraine patients, *Can. J. Neurol. Sci.* 38(1)124-128.

Vanmolkot FH, de Hoon JH (2007) Increased C-reactive protein in young adult patients with migraine. *Cephalalgia* 27:843-846.

Vos T, Allen C, Arora M et al. (2015) Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet* 388:1545-1602. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31678-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31678-6)

Vurucu S, Karaoglu A, Paksu M et al. (2013) Relationship between oxidative stress and chronic daily headache in children. *Hum Exp Toxicol.* 32:113-119. <https://doi.org/10.1177/0960327112459204>

Yigit M, Sogut O, Tataroglu Ö et al. (2018) Oxidative/antioxidative status, lymphocyte DNA damage, and urotensin-2 receptor level in patients with migraine attacks. *Neuropsychiatric Disease and Treatment* 14:367-374. <https://doi.org/10.2147/NDT.S156710>

Yilmaz N, Aydin O, Yegin A et al. (2011) Increased levels of total oxidant status and decreased activity of arylesterase in migraineurs. *Clin Biochem.* 44(10-11):832-837.

6 CONCLUSÕES GERAIS

De acordo com os resultados apresentados no presente estudo, podemos concluir que o grupo composto exclusivamente por participantes do sexo masculino apresentou redução da capacidade antioxidante total, assim como menor detecção das enzimas antioxidantes, no entanto não apresentou alteração significativa dos marcadores de dano relacionados ao estresse oxidativo, diferentemente do que ocorreu com os grupos compostos por mulheres. Esses achados evidenciam que há diferença no perfil oxidativo entre os sexos, em pacientes com enxaqueca.

Este estudo pode contribuir para a melhor compreensão do perfil dos pacientes, com o estabelecimento de diferentes fenótipos de enxaqueca, e para identificar novos marcadores que possam ajudar na compreensão da fisiopatologia e no manejo dos portadores de enxaqueca, visto que o perfil oxidativo apresentou diferenças significativas entre os grupos de homens e mulheres avaliados.

ANEXO A

CRITÉRIOS DE DIAGNÓSTICO DE ENXAQUECA SEM AURA (ICHD-3)

A - Apresentar ao menos 5 episódios preenchendo os critérios de B a D.
B. Episódios de cefaleia com duração de 4 a 72 horas (não tratada ou tratada sem sucesso)
C. A cefaleia tem, pelo menos, duas das quatro características seguintes: <ol style="list-style-type: none">1. localização unilateral2. pulsátil3. dor moderada ou grave4. agravamento por atividade física de rotina ou seu evitamento (por exemplo, caminhar ou subir escadas)
D. Durante a cefaleia, pelo menos, um dos seguintes: <ol style="list-style-type: none">1. náuseas e/ou vômitos2. fotofobia e fonofobia
E. Não melhor explicada por outro diagnóstico da ICHD-3 beta.

ANEXO B

CRITÉRIOS DE DIAGNÓSTICO DE ENXAQUECA COM AURA (ICHD-3)

A. Pelo menos dois episódios preenchem os critérios B e C
B. Um ou mais dos seguintes sintomas de aura, totalmente reversíveis: <ol style="list-style-type: none">1. Visual2. sensitivo3. fala e/ou linguagem4. motor5. tronco cerebral6. retiniano
C. Pelo menos duas das quatro características seguintes: <ol style="list-style-type: none">1. pelo menos um sintoma de aura alastra gradualmente em 5 ou mais minutos, e/ou dois ou mais sintomas aparecem sucessivamente2. cada sintoma individual de aura dura 5 a 60 minutos3. pelo menos um sintoma de aura é unilateral4. a aura é acompanhada, ou seguida em 60 minutos, por cefaleia
D. Não melhor explicada por outro diagnóstico da ICHD3 beta e foi excluído um acidente isquémico transitório.

ANEXO C

CRITÉRIOS DE DIAGNÓSTICO DE ENXAQUECA CRÔNICA (ICHD-3)

A. Cefaleia (idêntica à cefaleia de tipo tensão e/ou à da enxaqueca) em ≥ 15 dias por mês, durante > 3 meses e preenchendo os critérios B e C
B. Ocorrendo em um doente que tenha tido pelo menos cinco episódios preenchendo os critérios B-D de 1.1 <i>Enxaqueca sem aura</i> e/ou critérios B e C de 1.2 <i>Enxaqueca com aura</i>
C. Em ≥ 8 dias por mês durante > 3 meses, cumprindo algum dos seguintes: 1. critérios C e D de 1.1 <i>Enxaqueca sem aura</i> 2. critérios B e C de 1.2 <i>Enxaqueca com aura</i> 3. descrita pelo doente como enxaqueca no início e aliviada por um triptano ou ergotamínico
D. Não melhor explicada por outro diagnóstico da ICHD-3 beta.

ANEXO D

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação do perfil oxidativo e inflamatório de pacientes com enxaqueca atendidos em serviços de saúde no município de Viçosa - MG.

Pesquisador: Lucas Vilas Bôas Magalhães

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 88326618.2.0000.5153

Instituição Proponente: Departamento de Medicina e Enfermagem

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.706.366

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo transversal observacional, com pacientes encaminhados ao serviço especializado de neuropsiquiatria no município de Viçosa em Minas Gerais. Também serão selecionados pacientes atendidos na Unidade Básica de Saúde de São José do Triunfo e nos ambulatórios da Divisão de Saúde – UFV. Farão parte da pesquisa a totalidade de pacientes atendidos com o diagnóstico de enxaqueca, no período de julho a setembro de 2018, que preencham os requisitos estabelecidos, estejam de acordo com os critérios de inclusão e exclusão e concordem em assinar o termo de consentimento livre e esclarecido de acordo com a resolução 466/2012. Os pacientes, em atendimento ambulatorial, serão diagnosticados e categorizados de acordo com os critérios contidos na Classificação Internacional de Cefaleias (versão beta) de 2014 e divididos em três grupos, com idades de 18 a 55 anos :

- Mulheres portadoras de enxaqueca episódica (com e sem aura);- Mulheres portadoras de enxaqueca crônica;- Homens portadores de enxaqueca (episódica ou crônica).

Mediante o exposto, esse

Endereço: Universidade Federal de Viçosa, Avenida PH Rolfs s/n, Edifício Arthur Bernardes
Bairro: Campus Universitário **CEP:** 36.570-900
UF: MG **Município:** VICOSA
Telefone: (31)3899-2492 **E-mail:** cep@ufv.br

Continuação do Parecer: 2.706.366

trabalho propõe a quantificação de marcadores relacionados ao estresse oxidativo, em pacientes previamente diagnosticados com enxaqueca. O estresse oxidativo pode representar um evento-chave na fisiopatologia da enxaqueca e um alvo terapêutico adequado. Um maior conhecimento sobre esta questão pode contribuir para a compreensão da causa e complicações da enxaqueca e pode ser essencial para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar o perfil oxidativo e inflamatório de pacientes com enxaqueca atendidos em serviços de saúde no município de Viçosa - MG.

Objetivo Secundário:

- Categorizar os pacientes atendidos no serviço de referência;- Levantar dados socioeconômicos/ambientais e clínicos dos pacientes, voluntários;-

Realizar avaliação bioquímica de cada participante (hemograma e ácido úrico);- Realizar avaliação sorológica de marcador inflamatório (PCR);-

Dosagem de enzimas relacionadas com estresse oxidativo; e- Dosagem de marcadores de dano celular pelo estresse oxidativo (óxido nítrico, proteína carbonilada e peroxidação lipídica);

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Um dos riscos envolvidos na pesquisa consiste em constrangimento durante a consulta médica e ao responder o questionário, e para minimizar tal constrangimento o questionário será aplicado em local reservado e individualmente e você poderá se recusar a responder uma ou mais perguntas, sem que isso implique em qualquer alteração na forma como você será atendido (a) na unidade. No exame de sangue é possível que ocorram os seguintes desconfortos ou riscos: no momento da coleta de sangue poderá haver alguma dor decorrente da punção da pele; complicações de coleta de sangue rotineira são raras e geralmente de pequeno porte; se houver pequena perda de sangue da veia no local da punção geralmente há um pequeno desconforto que desaparece em poucos dias, mas os profissionais estão aptos a resolver o problema e prestar as devidas orientações e

Endereço: Universidade Federal de Viçosa, Avenida PH Rolfs s/n, Edifício Arthur Bernardes
Bairro: Campus Universitário **CEP:** 36.570-900
UF: MG **Município:** VICOSA
Telefone: (31)3899-2492 **E-mail:** cep@ufv.br

Continuação do Parecer: 2.706.366

cuidados

Benefícios:

Como benefícios da pesquisa, espera-se obter correlação entre a enxaqueca e o conhecimento do seu padrão inflamatório e do estresse oxidativo, permitindo ao médico que o acompanha usar de ferramentas para possíveis intervenções clínicas e tratamento adequados, visando melhorias na qualidade do cuidado. O motivo que nos leva a estudar estes fatores é para possibilitar que o Sistema Único de Saúde realize ações que possam ajudar a melhorar o atendimento.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O pesquisador propõe a quantificação de marcadores relacionados ao estresse oxidativo, em pacientes previamente

diagnosticados com enxaqueca. O estresse oxidativo pode representar um evento-chave na fisiopatologia da enxaqueca e um alvo terapêutico

adequado. Um maior conhecimento sobre esta questão pode contribuir para a compreensão da causa e complicações da enxaqueca e pode ser essencial para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O trabalho apresenta folha de rosto, TCLE, cronograma de execução, autorização do responsável pela local da pesquisa, e folha de rosto.

Recomendações:

Quando da coleta de dados, o TCLE deve ser elaborado em duas vias, rubricado em todas as suas páginas e assinado, ao seu término, pelo convidado a participar da pesquisa ou responsável legal, bem como pelo pesquisador responsável, ou pessoa(s) por ele delegada(s), devendo todas as assinaturas constar na mesma folha.

Não é necessário apresentar os TCLEs assinados ao CEP/UFV. Uma via deve ser mantida em arquivo pelo pesquisador e a outra é do participante da pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Ao término da pesquisa é necessário apresentar, via notificação, o Relatório Final (modelo disponível no site www.cep.ufv.br). Após ser emitido o Parecer Consubstanciado de aprovação do Relatório Final, deve ser encaminhado, via notificação, o Comunicado de Término dos Estudos para

Endereço: Universidade Federal de Viçosa, Avenida PH Rolfs s/n, Edifício Arthur Bernardes
Bairro: Campus Universitário **CEP:** 36.570-900
UF: MG **Município:** VICOSA
Telefone: (31)3899-2492 **E-mail:** cep@ufv.br

Continuação do Parecer: 2.706.366

encerramento de todo o protocolo na Plataforma Brasil.

Projeto aprovado autorizando o início da coleta de dados com os seres humanos a partir da data de emissão deste parecer.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1118444.pdf	16/05/2018 07:04:02		Aceito
Outros	cartaresposta.pdf	16/05/2018 07:02:48	Lucas Vilas Bôas Magalhães	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tclemodificado.pdf	16/05/2018 07:01:46	Lucas Vilas Bôas Magalhães	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	20/04/2018 11:21:27	Lucas Vilas Bôas Magalhães	Aceito
Cronograma	cronogramadeexecucao.pdf	20/04/2018 10:15:10	Lucas Vilas Bôas Magalhães	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetoprincipal.pdf	20/04/2018 10:11:20	Lucas Vilas Bôas Magalhães	Aceito
Outros	questionario.pdf	20/04/2018 10:09:43	Lucas Vilas Bôas Magalhães	Aceito
Outros	critériosdiagnosticos.pdf	20/04/2018 10:09:07	Lucas Vilas Bôas Magalhães	Aceito
Orçamento	orcamentofinanceiro.pdf	20/04/2018 10:07:27	Lucas Vilas Bôas Magalhães	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	autorizacaob.pdf	20/04/2018 10:07:09	Lucas Vilas Bôas Magalhães	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	autorizacaoa.pdf	20/04/2018 10:06:58	Lucas Vilas Bôas Magalhães	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle.pdf	20/04/2018 10:06:41	Lucas Vilas Bôas Magalhães	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Universidade Federal de Viçosa, Avenida PH Rolfs s/n, Edifício Arthur Bernardes
Bairro: Campus Universitário **CEP:** 36.570-900
UF: MG **Município:** VICOSA
Telefone: (31)3899-2492 **E-mail:** cep@ufv.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
VIÇOSA - UFV



Continuação do Parecer: 2.706.366

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

VICOSA, 11 de Junho de 2018

Assinado por:

**Maria da Conceição Aparecida Pereira Zolnier
(Coordenador)**

Endereço: Universidade Federal de Viçosa, Avenida PH Rolfs s/n, Edifício Arthur Bernardes
Bairro: Campus Universitário **CEP:** 36.570-900
UF: MG **Município:** VICOSA
Telefone: (31)3899-2492 **E-mail:** cep@ufv.br

Página 05 de 05

ANEXO E

COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO

Cellular and Molecular Neurobiology
EVALUATION OF THE OXIDATIVE AND INFLAMMATORY PROFILE OF PATIENTS WITH MIGRAINE
--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	CEMN-D-19-00192	
Full Title:	EVALUATION OF THE OXIDATIVE AND INFLAMMATORY PROFILE OF PATIENTS WITH MIGRAINE	
Article Type:	Original Article	
Keywords:	Headaches; Migraine; Oxidative damage; Inflammation; Total antioxidant status	
Corresponding Author:	Aline Vasconcelos Vaz Federal University of Viçosa Viçosa, Minas Gerais BRAZIL	
Corresponding Author Secondary Information:		
Corresponding Author's Institution:	Federal University of Viçosa	
Corresponding Author's Secondary Institution:		
First Author:	Aline Vasconcelos Martins Vaz	
First Author Secondary Information:		
Order of Authors:	Aline Vasconcelos Martins Vaz Rodrigo de Barros Freitas Palloma Porto Almeida Paula Dutra Ribeiro Daniel Silva Sena Bastos Leandro Licursi de Oliveira Sílvia Almeida Cardoso Lucas Vilas Bôas Magalhães	
Order of Authors Secondary Information:		
Funding Information:	FAPEMIG (APQ - 01023-18)	Mrs Sílvia Almeida Cardoso
Abstract:	<p>Among one of the most commonly seen and primary headaches is migraine. Oxidative stress and inflammation is discussed to be implicated in the pathogenesis of migraine. However, further knowledge about this issue is necessary because data are in part controversial and the possible underlying mechanisms remain inconclusive to date. To evaluate and compare the oxidative and inflammatory profile of patients with migraine 47 volunteers were divided into 3 groups: 15 women with chronic migraine (WCM); 17 women with episodic migraine (WEM) and 15 men with migraine (MM) and enrolled in this study.</p> <p>Total antioxidant status; the enzymatic activity of the antioxidant agents Catalase (CAT), Glutathione S-transferase (GST) and Superoxide Dismutase (SOD); oxidative stress markers malondialdehyde (MDA) and carbonylated proteins; blood count and neutrophil/lymphocyte ratio; uric acid, c-reactive protein and cholesterol total and fractions were determined in patients with migraine in the interictal phase. The group male participants (MM) displayed a reduction in total antioxidant status, as well as a lower value for antioxidant enzymes, but had no significant alterations in markers related to damage by oxidative stress compared to women. These findings suggest that there is a difference in the oxidative profile between the sexes among migraine patients. This may allow a better understanding of patients profile with different migraine phenotypes and identify new markers that might help understanding the</p>	

Powered by Editorial Manager® and ProduXion Manager® from Aries Systems Corporation

	pathophysiology and migraine patient management.
Suggested Reviewers:	<p>José Luiz Gherpelli Universidade de São Paulo jldg@osite.com.br The author has the expertise to evaluate my manuscript.</p>
	<p>Claudia Sobreira Universidade de São Paulo secfaepa@hcrp.usp.br The author has the expertise to evaluate my manuscript.</p>
	<p>Wilson Marques Júnior Universidade de São Paulo napena.usp@gmail.com The author has the expertise to evaluate my manuscript.</p>
	<p>Sirma Geyik University of Gaziantep drsirmageyik@hotmail.com The author has the expertise to evaluate my manuscript.</p>
	<p>Alireza Khosravi University of Medical Sciences alirezakh25@gmail.com The author has the expertise to evaluate my manuscript.</p>