

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO  
MINEIRO

ANA CAROLINA SILVA BITENCOURT

ANÁLISE DE CITOCINAS NO ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL

Uberaba  
2020

ANA CAROLINA SILVA BITENCOURT

ANÁLISE DE CITOCINAS NO ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro em Associação com a Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para o título de mestre em fisioterapia.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo José Luvizutto

Uberaba

2020

**Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do  
Triângulo Mineiro**

B536a Bitencourt, Ana Carolina Silva  
Análise de citocinas no Acidente Vascular Cerebral / Ana Carolina Silva  
Bitencourt. -- 2020.  
51 f. : il., fig., graf., tab.

Dissertação (Mestrado em Fisioterapia) -- Universidade Federal do  
Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2020  
Orientador: Prof. Dr. Gustavo José Luvizutto

1. Acidente Vascular Cerebral. 2. Citocinas. 3. Biomarcadores.  
4. Reabilitação do Acidente Vascular Cerebral. 5. Exercício Físico. 6. Dina-  
mômetro de Força Muscular. I. Luvizutto, Gustavo José. II. Universidade  
Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 616.831-005.1

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por colocar pessoas formidáveis nessa caminhada.

Aos meus pais por me darem toda a base necessária para seguir o caminho do conhecimento, especialmente minha mãe, Maria Luz, pelos cuidados.

Ao meu esposo, Rodolfo, pelo ser incrível que é. Companheiro da vida. Obrigada por me ensinar tanto, todos os dias. E principalmente por toda colaboração na realização do mestrado.

Ao meu orientador, professor doutor Gustavo José Luvizutto, por todo ensinamento e paciência.

A todos os docentes por dividirem seus conhecimentos.

À Júlia e Thaís pelas colaborações.

À secretária Marcela pela dedicação ao trabalho e paciência.

Aos profissionais de saúde do Pronto Socorro Adulto e enfermaria da neurologia do HC-UFTM pela colaboração.

À toda equipe do laboratório de imunologia da Pós-graduação de Medicina Tropical e Infectologia da UFTM pela importante contribuição.

Aos pacientes, sem os quais não existiria tal dissertação, e pelos quais tudo foi realizado.

À minha filha Sofia pela companhia desde o ventre nesta jornada.

## RESUMO

As citocinas vem sendo estudadas como biomarcadores inflamatórios e podem estar envolvidas desde a patogênese até a neurotoxicidade no Acidente Vascular Cerebral (AVC). Portanto diversos estudos vêm sendo conduzidos para inibir ou estimular a produção destes biomarcadores após AVC, com o objetivo de melhorar a progressão das consequências da doença. Os exercícios físicos alteram as citocinas circulantes, e podem auxiliar neste processo de recuperação no período pós-AVC. Nosso objetivo foi realizar uma revisão sistemática e metanálise sobre os efeitos do exercício físico nas citocinas após AVC, e, em seguida, analisar os níveis de citocinas circulantes e verificar a correlação com a gravidade da doença e força muscular. Para a revisão sistemática foram utilizadas sete bases de dados em busca de artigos com estratégia Patient-Intervention-Comparison- Outcomes-Study (PICOS). Para avaliação do risco de viés utilizamos os critérios descritos no Cochrane Handbook for Systematic Review of Interventions e a escala Physiotherapy Evidence Database e posteriormente foi realizada metanálise dos estudos com desfechos homogêneos. Nos pacientes na fase aguda de AVC os níveis de citocinas foram avaliados por meio dos métodos Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and Cytometric bead array (CBA). Estes níveis foram comparados entre pacientes e controles e correlacionados com força muscular manual e gravidade da doença avaliada pelo NIHSS. Na revisão obtivemos 14489 artigos nas bases de dados, sendo incluídos apenas 5 de acordo com critérios. Dos cinco artigos selecionados todos analisaram o marcador IL-6. Dois ensaios randomizados analisaram os níveis séricos de TNF- $\alpha$ . A análise qualitativa destes estudos mostrou divergências nas metodologias e dos resultados. Três estudos foram classificados para metanálise. Nenhum dos três ensaios randomizados correlacionaram os níveis das citocinas a nenhum desfecho clínico ou funcional, porém pode haver redução dos níveis de IL-6 e TNF- $\alpha$  quando analisados de forma associada. No estudo experimental, foram avaliados 17 pacientes com AVC na fase aguda. Foi observado redução dos níveis séricos de TNF- $\alpha$  e aumento de IL-6 e IL-10 no grupo AVC comparado ao controle. Observamos maior tendência na resposta anti-inflamatória dos pacientes. Além disso, os pacientes apresentaram uma baixa correlação positiva entre os níveis séricos de IL-6 e IL-10. Uma associação foi constatada entre IL12p70 com NIHSS e força de preensão palmar do lado afetado; IL-1 $\beta$  com força de preensão palmar do lado afetado; IL-6 com força de preensão palmar do lado não-afetado. Portanto concluímos que a revisão e metanálise mostrou que apesar dos indícios de redução de IL-6 e TNF- $\alpha$  associado ao exercício, a quantidade de estudos relacionados ao tema

ainda é reduzida. A comparação entre pacientes e controles apontou correlação entre algumas citocinas e escala de gravidade e força de preensão palmar.

Palavras-chave: Acidente Vascular Cerebral. Citocinas. Biomarcadores. Reabilitação do Acidente Vascular Cerebral. Exercício físico. Dinamômetro de força muscular. Gravidade no AVC.

## ABSTRACT

Cytokines has studied as inflammatory biomarkers and can be involved from pathogenesis to neurotoxicity in stroke. Therefore, several studies have been conducted to inhibit or stimulate the production of these biomarkers after a stroke, with the objective of improving the progression of the consequences of the disease. The physical exercises alter circulating cytokines, and can assist in this recovery process in the post-stroke period. Our objective was perform a systematic review and meta-analysis of the physical exercise effects on cytokines after stroke, and then analyze the levels of circulating cytokines and to verify the correlation with the severity of the disease and muscle strength. For the systematic review, seven databases were used in search of articles with the Patient-Intervention-Comparison- Outcomes-Study (PICOS) strategy. To assess the risk of bias, we used the criteria described in the Cochrane Handbook for Systematic Review of Interventions and the Physiotherapy Evidence Database scale and subsequently a meta-analysis of the studies with homogeneous outcomes was performed. In patients with acute stroke, cytokine levels were assessed using the Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and Cytometric bead array (CBA) method. These levels were compared between patients and controls and correlated with manual muscle strength and disease severity assessed by NIHSS. In the review, we obtained 14489 articles in the databases, of which only 5 were included according to criteria. Five selected articles, all analyzed the IL-6. Two randomized trials analyzed serum levels of TNF- $\alpha$ . The qualitative analysis of these studies showed differences in methodologies and results. Three studies were classified for meta-analysis. None of the three randomized trials correlated cytokine levels with any clinical or functional outcome, but there may be a reduction in IL-6 and TNF- $\alpha$  levels when analyzed in an associated way. In the experimental study, 17 patients with stroke in the acute phase were evaluated. A reduction in serum TNF- $\alpha$  levels and an increase in IL-6 and IL-10 were observed in the stroke group compared to the control group. We observed a greater tendency in the patients' anti-inflammatory response. In addition, patients had a low positive correlation between serum IL-6 and IL-10 levels. An association was found between IL12p70 with NIHSS and hand grip strength on the affected side; IL-1 $\beta$  with handgrip strength on the affected side; IL-6 with handgrip strength on the unaffected side. Therefore, we conclude that the review and meta-analysis showed that despite the signs of reduced IL-6 and TNF- $\alpha$  associated with exercise, the number of studies related to the topic is still reduced. The comparison between patients and controls showed a correlation between some cytokines and the severity scale and

handgrip strength.

Keywords: Stroke. Cytokines. Biomarkers. Rehabilitation of Stroke. Physical exercise. Muscle strength dynamometer. Stroke severity.



## LISTA DE FIGURAS

### ARTIGO 1

Figura 1	Fluxograma para seleção dos artigos .....	21
Figura 2	Risco de viés dos estudos incluídos.....	24
Figura 3	Risco de viés dos estudos incluídos .....	25
Figura 4	Metanálise funnel plot dos ensaios clínicos randomizados .....	26

### ARTIGO 2

Figura 1	Gráficos de comparação entre os valores dos níveis de citocinas, e receptores séricos de controles e pacientes (AVC).....	38
Figura 2	Correlação entre os valores dos níveis séricos de citocinas (IL-6/IL-10) do grupo AVC (pacientes).....	39
Figura 3	Matriz de correlação entre variáveis independentes e dependentes.....	40

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO 1

Tabela 1	Características dos estudos Incluídos .....	22
Tabela 2	Características dos desfechos e resultados dos estudos incluídos .....	22

### ARTIGO 2

Tabela 1	Variável clínica e sociodemográfica dos pacientes incluídos no estudo....	36
----------	---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

ASA	American Stroke Association
AVC	Acidente Vascular Cerebral
AVCi	Acidente Vascular Cerebral Isquêmico
AVCh	Acidente Vascular Cerebral Hemorrágico
AVERT	Very Early Rehabilitation Trial after stroke
DP	Desvio Padrão
ECAS III	European Cooperative Acute Stroke Study III
ECG	Escala De Coma De Glasgow
ECNR	Ensaio Clínico Não Randomizado
ECR	Ensaio Clínico Randomizado
EMBASE	Evidence medical of base
ET	Exercício de treinamento
FC	Frequência Cardíaca
IL	Interleucina
GC	Grupo Controle
GI	Grupo Intervenção
HC	Hospital de clínicas
IFN- $\gamma$	Interferon gama
IFN- $\alpha$	Interferon-alfa
IFN- $\beta$	Interferon-beta
LILACS	Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde
MEDLINE	Medical Literature Analysis and Retrieval System Online
MESH	Medical Subject Headings
Min.	Minutos
MI	Membro inferior
MI	Mililitro
MRC	Medical Research Council
MS	Memro superior
N	Número
NIHSS	National Institute Of Health Stroke Scale
NINDS	National Institute of Neurological Disorders and Stroke
PedRO	Physiotherapy Evidence Database
PCR	Proteína C reativa
PICOS	Patient-Intervention-Comparison- Outcomes-Study
pg/ml	Picograma por mililitro
PRISMA	Principais itens para relatar Revisões sistemáticas e Metanálises
PTR	Programa de de treinamento de reabilitação
PUBMED	National Library of Medicine National Institutes of Health
SNC	Sistema Nervoso Central
START	State Of The Art Through Systematic Review
TGF- $\beta$	Fator de crescimento tumoral beta
Th	T helper
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral alfa
Treg	T regulatória
UFTM	Universidade Federal do Triângulo Mineiro
VO2	Consumo de oxigênio

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	14
2.1 OBJETIVO GERAL.....	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	15
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	16
4.1 ARTIGO 1.....	16
<b>4.1.1 Resumo</b> .....	16
<b>4.1.2 Introdução</b> .....	17
<b>4.1.3 Materiais e métodos</b> .....	18
4.1.3.1 Seleção dos estudos.....	19
4.1.3.2 Extração de Dados.....	19
4.1.3.4 Síntese de dados.....	20
<b>4.1.4 Resultados</b> .....	20
<b>4.1.5 Metanálise</b> .....	25
<b>4.1.6 Discussão</b> .....	26
<b>4.1.7 Conclusão</b> .....	28
<b>4.1.8 Referências</b> .....	28
4.2.ARTIGO 2.....	31
<b>4.2.1 Resumo</b> .....	31
<b>4.2.2 Introdução</b> .....	32
<b>4.2.3 Materiais e métodos</b> .....	33
4.2.3.1 Desenho e local do estudo.....	33
4.2.3.2 População do estudo.....	33
4.2.3.3 Variáveis.....	34
4.2.3.4 Instrumentos utilizados e procedimentos.....	34
4.2.3.5 Variáveis independentes.....	35
4.2.3.5.1 <i>Material biológico</i> .....	35
4.2.3.6 Análise estatística.....	36
<b>4.2.4 Implicações éticas</b> .....	36
<b>4.2.5 Resultados</b> .....	36
<b>4.2.6 Discussão</b> .....	41
<b>4.2.7 Conclusão</b> .....	43
<b>4.2.8 Referências</b> .....	44
<b>5 CONCLUSÃO</b> .....	48
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	49

## 1 INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares e cerebrovasculares são as principais causas de morbidade e mortalidade nos países industrializados. Em 2015, aproximadamente 17,7 milhões de pessoas morreram no mundo. Desses óbitos, 6,7 milhões foram decorrentes ao Acidente Vascular Cerebral (AVC), onde no Brasil, é a segunda causa de morte e a primeira de incapacidade crônica, que no mesmo ano, 100.520 pessoas morreram em decorrência da doença e registrou-se 212.047 internações relacionadas ao AVC, conforme dados do Ministério da Saúde (WHO, 2017, PORTAL DO GOVERNO, 2018).

O AVC é definido como evento súbito de origem vascular, sendo classificado em: AVC isquêmico, causado por bloqueio do fluxo sanguíneo ao cérebro ou AVC hemorrágico, gerado por lesão vascular e extravasamento de sangue para área cerebral ou tronco encefálico (acidente vascular cerebral hemorrágico intraparenquimatoso) ou para dentro das meninges (hemorragia subaracnóidea). A hemorragia intraparenquimatoso, é o subtipo mais comum de hemorragia cerebral, acometendo cerca de 15% de todos os casos de AVC. Frequentemente os pacientes apresentam fraqueza ou parestesia em hemicorpo ou face, dificuldade para falar entender coisas simples, engolir, andar e enxergar, tontura e dor de cabeça intensa, todos, de forma súbita (MEHTA; EAGLE, 1998).

Segundo a American Stroke Association (ASA), National Institute of Neurological Disorders and Stroke (NINDS) e European Cooperative Acute Stroke Study III (ECASS III), quanto mais rápido ocorre o atendimento do paciente com AVC, maiores são as chances de bons prognósticos. Isto porque procedimentos específicos podem reverter ou minimizar os processos fisiopatológicos decorrentes da lesão cerebral (MARLER, et al, 1995; HACKE W, et al, 2008; GEMPAS, 2018).

O processo fisiopatológico do AVC é caracterizado por necrose do tecido cerebral, quebra da barreira hematoencefálica, liberação de mediadores inflamatórios e infiltração de leucócitos (RAMIRO et al., 2018). A atividade imune faz parte de qualquer processo fisiopatológico como um sistema que tem por função manter a homeostasia do organismo. O papel do sistema imune no AVC está sendo investigado, em todas as fases da doença para determinar a importância da ação celular e humoral na lesão e repercussão no quadro clínico. As citocinas parecem ter um importante papel associado ao grau de inflamação e consequentemente na gravidade da lesão, portanto sendo apontadas como biomarcadores. Além disso, o tempo parece ser um fator determinante para definir se a imunidade e a inflamação são neuroprotetoras ou neurotóxicas (MALONE et al., 2018). Desde

a descoberta das citocinas a partir de 1957, funções cada vez mais específicas destas proteínas vem sendo descritas. Hoje tem mais de 300 citocinas divididas por famílias de acordo com características estruturais e funcionais. Grande parte das citocinas são produzidas por células do sistema imune e por tecidos diversos. Estas substâncias são produzidas em diferentes situações, porém se destacam nos processos inflamatórios devido a lesões ou infecções. Inicialmente foram descobertas como substâncias que interferiam em infecções e nos processos inflamatórios (DINARELLO, 2007).

A primeira citocina identificada foi o Interferon-alfa (IFN- $\alpha$ ) como uma proteína capaz de inibir a replicação viral (ISAACS; LINDENMANN, 1957), e em seguida, em 1965, a atividade do Interferon-beta (IFN- $\beta$ ) foi descrita (WHEELLOCK, 1965). Ambas associadas desde o início como parte de mediadores inflamatório derivados de linfócitos. O termo “interleucina” ou “citocina” surgiu mais tarde, devido a um maior esclarecimento em relação as diversas funções em situações fisiológicas (GERY; WAKSMAN, 1972, GEORGE et al., 2012).

As divisões em famílias e classes funcionais são primeiramente em relação a estrutura molecular por sua vez a função. Devido algumas citocinas estarem envolvidas na diferenciação e crescimento de linfócitos T helper (Th) (DINARELLO, 2007). A polarização de linfócitos Th pode ser dividida hoje de modo geral em resposta Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, T folicular e T regulatória (Treg), as quais podem ser verificadas por meio da predominância dos níveis das citocinas presentes em determinado tecido ou circulantes (ARAUJO-PIRES et al., 2014). Atualmente estas classes funcionais de citocinas que caracterizam a resposta Th são estudadas como perfis potenciais de parte da resposta imune de diversas doenças, por serem alvos importantes para tratamento medicamentoso (SCHWARTZ et al., 2016).

Esta dissertação consiste em dois artigos científicos cujo o primeiro abordou os efeitos do exercício físico sobre as citocinas após Acidente Vascular Cerebral e o segundo os níveis deste biomarcador na fase aguda da doença e sua associação com a gravidade e força muscular.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Verificar os efeitos do exercício físico sobre as citocinas após Acidente Vascular Cerebral e analisar os níveis deste biomarcador na fase aguda da doença e sua associação com a gravidade e força muscular.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Realizar uma revisão sistemática da literatura com artigos que envolvam citocinas e reabilitação em pacientes com AVC para verificar os efeitos do exercício físico sobre os níveis deste biomarcador;
- Elaborar um estudo transversal para verificar as principais respostas inflamatórias na fase aguda do AVC por meio de níveis de citocinas e sua associação com gravidade do quadro neurológico e força muscular.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os artigos científicos de cada estudo tiveram metodologias distintas e estão descritas dentro de cada respectivo artigo.

No artigo 1, foi realizada revisão sistemática de literatura para responder a pergunta: qual o efeito do exercício físico em paciente com AVC nos biomarcadores inflamatórios do tipo citocinas quando comparado ao grupo controle? Para responder essa pergunta utilizamos os critérios descritos no *Cochrane Handbook for Systematic Review of Interventions*.

No artigo 2, foi realizado estudo transversal em pacientes com AVC nas primeiras 72 horas. O objetivo desse estudo foi responder se há diferenças entre os níveis de citocinas na fase aguda quando comparado ao grupo controle de indivíduos neurologicamente saudáveis e se há associação entre gravidade do quadro neurológico e força muscular com este biomarcador.



## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussões de cada artigo serão apresentados abaixo.

### 4.1 ARTIGO 1

TÍTULO: EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO NO PERFIL INFLAMATÓRIO NO ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL: REVISÃO SISTEMÁTICA E METANÁLISE

#### 4.1.1 Resumo

**Introdução:** As citocinas, também conhecidas como biomarcadores inflamatórios, estão envolvidas desde a patogênese dos fatores de risco até a neurotoxicidade no Acidente Vascular Cerebral (AVC). Diversos estudos vêm sendo conduzidos para inibir ou estimular a produção de biomarcadores após AVC com o objetivo de melhorar a funcionalidade. Os exercícios físicos podem auxiliar neste processo, pois são capazes de alterar os níveis de citocinas em várias doenças incluindo no período pós-AVC. **Objetivo:** O objetivo desse estudo foi realizar uma revisão sistemática da literatura para verificar a efetividade do exercício físico nos níveis de citocinas após AVC. **Métodos:** As bases de dados para busca foram PUBMED, MEDLINE, LILACS, SCIENCE DIRECT, WEB OF SCIENCE, SCOPUS e EMBASE, nos idiomas português, inglês e espanhol, utilizando os termos *stroke and “physical therapy specialty” or “kinesiology, applied” or exercise or “rehabilitation” and “inflammation mediators” or biomarkers or cytokines*. Para avaliação do risco de viés de cada estudo utilizamos os critérios descritos no *Cochrane Handbook for Systematic Review of Interventions* e a escala Physiotherapy Evidence Database. Posteriormente foi realizada metanálise dos estudos com desfechos homogêneos. **Resultados:** Na metanálise não houve diferença no nível de IL-6 entre grupo experimental e controle (SMD: -1,56; IC95% -3,36 a 0,24; I<sup>2</sup>: 93%; p =0,09) e TNF- $\alpha$  (SMD:-0,18; IC=95% -0,60 a -0,25; I<sup>2</sup>: 0%; p = 0,41). Quando os desfechos foram associados houve redução estatisticamente significativa a favor do grupo experimental (SMD:-0,96; IC=95%: -1,85 a -0,07; I<sup>2</sup>:88%; p = 0,03). **Conclusão:** O exercício reduz citocinas quando associados a IL-6 e TNF- $\alpha$ , porém, devido ao baixo tamanho amostral e risco de viés aumentado dos estudos incluídos, recomenda-se a realização de ensaios clínicos multicêntricos com maior tamanho amostral para resultados mais robustos.

**Palavras-chave:** Acidente Vascular Cerebral. Exercícios. Mediadores inflamatórios.

### 4.1.2 Introdução

No Acidente Vascular Cerebral (AVC) ocorre uma resposta inflamatória caracterizada pela liberação e produção de citocinas por meio de células ativadas como neurônios, astrócitos, micróglia e células endoteliais [1,2]. Neste processo inflamatório, estes biomarcadores, ou seja, citocinas, estão sendo consideradas como importantes indicadores para o monitoramento dos resultados de recuperação do tecido cerebral [3], bem como apresentam papel promissor para o diagnóstico e prognóstico funcional de pacientes com AVC [4,5].

Diferentes níveis circulantes de biomarcadores inflamatórios, como as interleucinas, podem indicar diferentes fases da doença ou progressão dos sinais e sintomas do AVC [5]. A fase aguda do AVC é marcada por resposta imune mediada pela necrose do tecido cerebral, quebra de barreira hematoencefálica e liberação de mediadores inflamatórios, o que desencadeia a infiltração de leucócitos no tecido cerebral [6,7].

Após o AVC ocorre aumento principalmente da interleucina 1 (IL-1) e fator de necrose tumoral- alfa (TNF- $\alpha$ ) [4,5]. Os níveis de IL-6 e TNF- $\alpha$  são normalmente encontrados aumentados em pacientes com doenças cardioembólicas [8]. Na primeira semana do AVC já pode ser observado aumento de citocinas no plasma como IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IL-23, TGF- $\beta$  fator de crescimento tumoral beta (TGF- $\beta$ ) [9]. Outros estudos também descrevem alterações nos níveis de citocinas após AVC, sendo elas IL-23 e IL-6 [10], e IL-10 e TGF- $\beta$  [11].

Atualmente, diversos estudos vêm sendo conduzidos para inibir ou estimular a produção de biomarcadores após AVC [12,13] com objetivo de melhorar o desfecho funcional, sendo que os exercícios físicos podem desempenhar um papel importante neste processo. O exercício físico tem papel fundamental para prevenção e/ou tratamento de diversas doenças crônicas por desencadear mudanças diretas e indiretas no sistema imune, endócrino e/ou sistema nervoso central [14]. Os resultados da prática do exercício físico são alterações crônicas que resultam na redução de quadros inflamatórios em diversas doenças relacionados com a alteração de algumas citocinas circulantes [15].

Os exercícios físicos podem ser aplicados em diversas fases do AVC, seja na fase aguda (1-7 dias), subaguda precoce (7 dias a 3 meses), subaguda tardia (3 a 6 meses) e/ou crônica (acima de 6 meses) [16,17]. Na fase aguda do AVC é recomendado que o exercício seja iniciado após 24 horas com ictus com menor intensidade e duração [18], porém, estudos mostram que o exercício físico de intensidade moderada a alta nas fases mais tardias [19,20],

bem como de intensidade baixa durante o processo de reabilitação neurofuncional [21,22], pode provocar diminuição em marcadores inflamatórios após AVC.

Apesar dos diferentes resultados promissores em relação a manipulação da ação das citocinas, pouco se tem feito para verificar a ação das mesmas no desempenho sensório-motor, melhora da força muscular ou aptidão física após o AVC. Portanto, é essencial mais estudos para traçar os perfis de resposta Th (*T helper*) por meio da dosagem de citocinas séricas e sua relação com exercício e como esta relação pode interferir no prognóstico funcional de pacientes com AVC. Até o momento não há evidências de alto nível metodológico para afirmar que o exercício físico ou a reabilitação física em pacientes com AVC podem modificar a concentração de biomarcadores inflamatórios, bem como o impacto à longo prazo [21–24]. Portanto, o objetivo desta revisão sistemática foi verificar o efeito do exercício físico nos biomarcadores inflamatórios após AVC.

#### 4.1.3 Materiais e métodos

Para esta revisão nós incluímos ensaios clínicos randomizados, ensaios *quasi*-randomizados e estudos não-randomizados de janeiro de 1999 até outubro de 2020. O número de registro na PROSPERO é: CRD42020219084.

No desenvolvimento dessa revisão sistemática foram adotados itens recomendados no protocolo de revisão sistemática, por meio do checklist PRISMA (Principais itens para relatar Revisões sistemáticas e Metanálises). Para desenvolvimento da estratégia de busca, assim como critérios de inclusão e exclusão, utilizamos a estratégia PICOS (a) Participantes, b) Intervenções, c) Controle, d) Desfechos e) Desenho do estudo), os quais foram determinados para esse estudo: a) Pacientes com AVC, b) Exercício físico, c) Qualquer comparação, d) biomarcadores e e) ensaios clínicos randomizados, *quasi*-randomizados ou não-randomizados.

Na busca virtual de estudos, utilizamos as bases de dados PUBMED, MEDLINE, LILACS, SCIENCE DIRECT, WEB OF SCIENCE, SCOPUS e EMBASE, nos idiomas português, inglês e espanhol, de 1999 até outubro/2020. As palavras-chave e seus sinônimos foram verificados por meio do MESH terms (Medical Subject Headings) e com auxílio de profissional qualificado para desenvolvimento de estratégia de busca. Dessa forma, foram utilizados os seguintes termos e seus sinônimos: *stroke and “physical therapy specialty” or “kinesiology, applied” or exercise or “rehabilitation” and “inflammation mediators” or*

*biomarkers or cytokines.*

#### 4.1.3.1 Seleção dos estudos

Foram incluídos estudos nos quais indivíduos com AVC fossem os sujeitos, a avaliação do perfil inflamatório realizada por meio de biomarcadores do tipo citocinas, inclusão de grupo controle e apresentação do desfecho incluindo citocinas após exercício físico. Foram excluídos: artigos duplicados; revisões sistemáticas; artigos indisponíveis na íntegra, capítulos ou resumos; estudos experimentais. Para a organização de desenvolvimento da análise dos estudos, utilizamos o programa START (*State of the Art through Systematic Review*), desenvolvido pelo laboratório de Pesquisa em Engenharia de Software da Universidade Federal de São Carlos.

#### 4.1.3.2 Extração de Dados

Foram coletados de todos os artigos selecionados para o estudo: definição do sujeito, metodologia, tamanho da amostra, mensuração de variáveis, método de análise e extração dos valores de média e desvio padrão de alguns desfechos.

Dois autores dessa revisão avaliaram independentemente os dados dos estudos incluídos. As discrepâncias foram resolvidas por discussão entre os autores e utilizado um formulário de extração de dados padrão, com base nas recomendações da *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions*. Análise do risco de viés dos estudos incluídos.

Avaliamos o risco de viés de acordo com os seguintes domínios:

- Geração de sequência aleatória
- Ocultação de alocação
- Ocultação de participantes e profissionais
- Ocultação da avaliação de resultados
- Dados de resultados incompletos
- Relatório de resultado seletivo
- Outro viés

Classificamos o risco de viés para cada domínio como alto ou baixo e fornecemos

informações do relatório do estudo, juntamente com a justificativa para nosso julgamento, nas tabelas "Risco de viés". Também foi utilizada a escala PEDro (Physiotherapy Evidence Database) pra avaliação de viés. Baseia-se na lista de Delphi, desenvolvida por Verhagen et al. [25] e consiste em verificar os critérios de elegibilidade, randomização e ocultação de alocação, semelhança entre grupos e sujeitos, verificar se terapeutas e avaliadores eram cegos, permanência de 85% dos sujeitos que iniciaram o estudo, análise de resultado por intenção de tratar, comparação inter-grupos e medida de precisão e de variabilidade em pelo menos um desfecho. O total da escala é de 10 pontos, sendo quanto maior, menor o risco de viés.

#### 4.1.3.4 Síntese de dados

Quando consideramos os estudos semelhantes com desfechos homogêneos realizamos a metanálise dos dados utilizando o software RevMan5.3 . Foi calculado a diferença média padronizada de variância inversa combinada (SMD) e intervalos de confiança (ICs) de 95% entre os grupos usando modelos de efeitos aleatórios. A variabilidade nos resultados entre os estudos foi analisada pela estatística  $I^2$  e o valor p obtido a partir do teste de chi quadrado. Para determinar a diferença entre a média dos grupos (experimental – exercício físico e controle – qualquer comparação) foi utilizada a estatística Z, sendo considerada significativa estatisticamente se  $p < 0,05$ .

#### 4.1.4 Resultados

Foram identificados 14489 estudos (PUBMED: 413; MEDLINE: 755; EMBASE: 106; SCIENCE DIRECT: 13158; SCOPUS: 57). Após a leitura de títulos e resumos, selecionou-se 23 estudos para análise de elegibilidade, sendo 7 excluídos por se tratarem de estudos prospectivos, 9 revisões da literatura, 2 estudos experimentais. No total foram incluídos 3 ensaios clínicos randomizados [20–22], 1 ensaio clínico não randomizado [23] e 1 estudo transversal [26] para análise qualitativa, e apenas três ensaios clínicos randomizados [20–22] para a metanálise. O fluxograma a seguir desenha o resultado obtido (Figura 1).

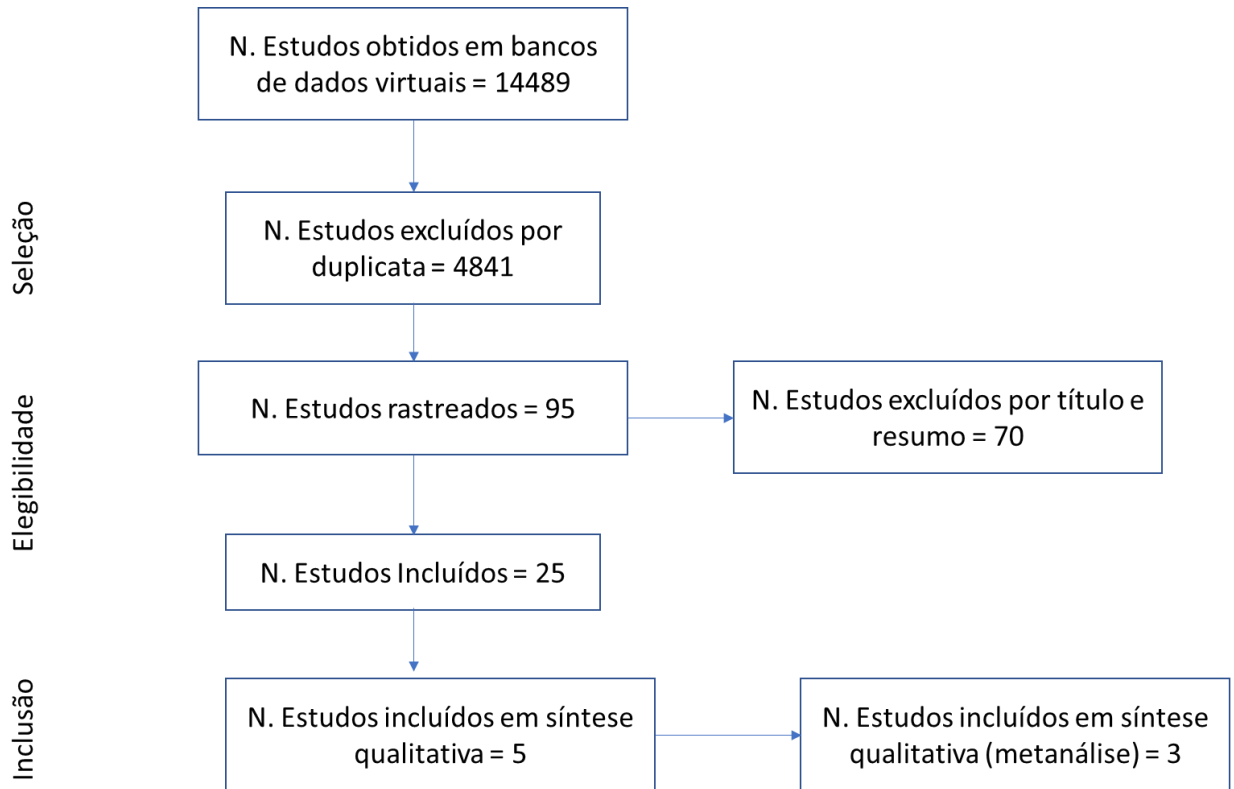


Figura 1: Fluxograma para seleção dos artigos.

Legenda: N.: Número

Fonte: Elaborado pela autora.

As características relevantes de cada estudo incluído na análise qualitativa estão descritas na tabela 1 e tabela 2. Dos estudos incluídos na análise qualitativa, 3 foram ensaios clínicos randomizados [20–22], 1 transversal [26] e 1 ensaio clínico não-randomizado [23]. O tamanho amostral do grupo intervenção foi 104 e do grupo controle 98 participantes. A média de idade dos indivíduos do grupo experimental foi 64.15 ( $\pm 5.24$ ) anos e do grupo controle 61.44 ( $\pm 6$ ) anos. Todos os estudos incluíram os pacientes nas fases sub-agudas e crônica. A média na pontuação da escala PEDro foi de 4 ( $\pm 2$ ).

**Tabela 1:** Características dos estudos incluídos.

Autor/Ano	Desenho do estudo	N/Idade (média ±DP)	Tempo de AVC	Escala de PEDro	Período de coleta de sangue
Krawczyk et al., 2019	ECR	GI: 31/63.7±8.9 GC:26/63.7±9.2	21 dias	7/10	Antes e após 3 meses de intervenção
Chen et al., 2015	ECR	GI:13/64.7±13.5 GC:12/67.1±11.9	6 meses	3/10	Antes e após 4 semanas de exercícios
Hsu et al., 2019	ECR	GI:15/55.7±3.0 GC:15/57.8±3.9	>3 meses	5/10	Antes e após 4 semanas de exercícios
Sprick et al., 2020	Transversal	GI: 25/67.08 ±10.09 GC: 21/52.8 ±8.2	>6meses	3/10	12 horas de jejum após protocolo apenas grupo intervenção
Manolescu et al., 2011	ECNR	GI: 20/69.60±2.51 GC: 24/65.83±2.03	<3MESES	2/10	Hospitalizaçãoe alta no grupo intervenção; Apenas um momento no controle

Legenda: AVC: Acidante Vascular Cerebral; ECR: Estudo Controlado Randomizado; DP: Desvio Padrão; GI: Grupo intervenção; GC: Grupo controle.

Fonte: Elaborado pela autora.

**Tabela 2:** Características dos desfechos e resultados dos estudos incluídos.

Autor/Ano	Biomarcadores	Grupos	Resultados
Krawczyk et al. 2019	IL-6 e TNF- $\alpha$	GC: Orientação de exercícios e mudança de vida; GI:Exercícios aeróbicos (3x3min, 2 min. Descanso, 5 dias/12semanas).	- GI: Redução não significativa de IL-6; - GC: aumento não significativo de IL-6; - aumento não significativo de TNF- $\alpha$ em ambos os grupos.

Chen et al. 2015	IL-6, TNF- $\alpha$ e PCR	3 séries por dia; 5 dias/semana; 4 semanas; GI: Fortalecimento isocinético. GC: Fortalecimento isotônico.	- GI: redução significativa de IL-6 e TNF- $\alpha$ ; - GC: redução significativa apenas de IL-6; - Redução não significativa de PCR em ambos os grupos.
Hsu et al. 2019	IL-6	GC: PTR (neurofacilitação, balanço, exercício terapêutico) 30 a 45 minutos. GI: PTR + ET: 5 sessões/semana em 4 semanas -Aquecimento com 30% VO <sub>2</sub> pico por 3min, seguido de 60% do VO <sub>2</sub> pico por 30 min., e desaquecimento 30% VO <sub>2</sub> pico por 3min. Em bicicleta ergométrica.	- GI reduziu consideravelmente os níveis plasmáticos de IL-6; - GC: não houve redução no IL-6 no plasma.
Sprick et al. 2020	IL-6 e PCR	Ambos os grupos realizaram exercício de intensidade máxima em esteira de acordo com protocolo de Naughton até comunicação de fadiga.	- Não houve correlação significativa entre biomarcador inflamatório e pressão arterial. - Houve correlação negativa entre PCR e FC
Manolescu et al., 2011	IL-1 $\alpha$ IL-6 IL-8 TNF- $\alpha$	GC: Sujeitos saudáveis voluntários; GI: Pacientes com AVC internados para realizar procedimentos de reabilitação (início da internação e alta hospitalar).	- Maior concentração de IL-6 e TNF- $\alpha$ nos pacientes com AVC; - GI: diminuição de IL-1 $\alpha$ e aumento de IL-6 e IL-8 não significativo.

Legenda: IL-1 $\alpha$ : Interleucina 1 alfa; IL-6: Interleucina 6; IL-8: Interleucina 8; TNF- $\alpha$ : Fator de Necrose Tumoral-alfa; PCR: Proteína C Reativa; min.: minutos; GI: Grupo intervenção; GC: Grupo controle; p<0,05: índice de significância; FC: frequência cardíaca; MS: membro superior; MI: membro inferior; PTR: Programa de de treinamento de reabilitação; ET: Exercício de treinamento; VO<sub>2</sub>: Consumo de oxigênio, AVC: Acidente Vascular Cerebral.

Fonte: Elaborado pela autora.

Dos cinco artigos selecionados para análise qualitativa, todos analisaram o marcador



IL-6. Além deste marcador, dois ensaios randomizados [21,22] analisaram os níveis séricos de TNF- $\alpha$ . No estudo de Chen et al. [22] foi verificada redução destas citocinas após período de intervenção. Já no estudo de Krawczyk et al. [21] não houve alterações significativas das citocinas analisadas após acompanhamento. Nenhum dos três ensaios randomizados correlacionaram os níveis das citocinas a nenhum desfecho clínico ou funcional. No estudo transversal, Sprick et al. [26] fizeram análise de correlação entre IL-6 e PCR com a pressão arterial, porém não houve resultado significativo. No ECNR de Manolescu et al. [23], houve correlação das condições patológicas e as alterações de IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$  e correlação significativamente negativa de idade de pacientes com AVC e marcadores inflamatórios do momento da hospitalização até alta.

Abaixo, nas figuras 2 e 3 estão representados os riscos de viés dos estudos incluídos.

Observa-se que os estudos com melhores pontuações foram os ensaios clínicos randomizados. O estudo de Krawczyk et al. [21] obteve o menor risco de viés, pois pontuou alto risco apenas em cegamento de participantes e apresentar desfechos incompletos devido perdas amostrais. Hsu et al. [20] pontuaram alto risco apenas por dados incompletos de desfechos, devido perdas amostrais e descrições incompletas. Chen et al. [22], pontuou baixo risco apenas na randomização e outros vieses. O único estudo que pontuou baixo risco de viés para dados de desfecho incompleto foi o de Manolescu et al. [23]. O estudo com pior avaliação é o estudo de Sprick et al. [26], pois não houve randomização, ocultação de alocação, e cegamento.

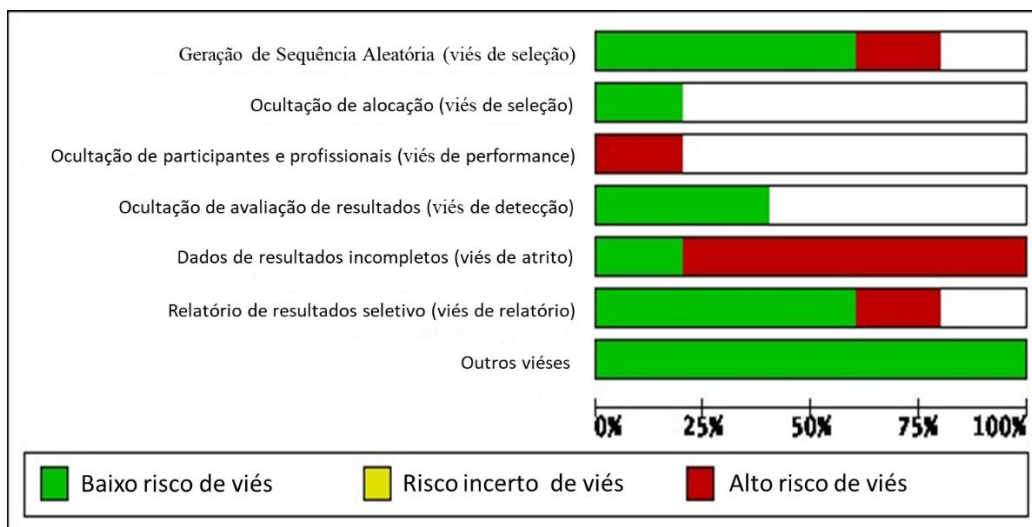


Figura 2. Risco de viés dos estudos incluídos.

Fonte: Elaborado pela autora.

	Sprick 2020	Manolescu 2011	Krawczyk 2019	Hsu 2019	Chen 2015	
	+	+	+	+	+	Geração de Sequência Aleatória (viés de seleção)
		+				Ocultação de alocação (viés de seleção)
			-			Ocultação de participantes e profissionais (viés de performance)
		+	+			Ocultação de avaliação de resultados (viés de detecção)
	-	+	-	-	-	Dados de resultados incompletos (viés de atrito)
	-	+	+	+		Relatório de resultados seletivo (viés de relatório)
	+	+	+	+	+	Outros viéses

Figura 3: Risco de viés dos estudos incluídos.

Fonte: Elaborado pela autora.

#### 4.1.5 Metanálise

Foi realizado metanálise para desfechos homogêneos, utilizando o gráfico de funnel plot dos estudos com desenho do tipo ECR [20–22]. Os três estudos avaliaram o marcador inflamatório de IL-6, sendo que não houve diferença significativa nessa variável quando comparado aos grupos experimental e controle (SMD: -1,56; IC95% -3,36 a 0,24; I<sup>2</sup>: 93%; p =0,09). Apenas dois estudos incluíram o desfecho TNF- $\alpha$  [21,22], sendo que também não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (SMD:-0.18; IC=95% -0.60 a -0.25; I<sup>2</sup>: 0%; p = 0,41).

Quando os dois desfechos foram associados, houve diferença estatisticamente a favor do grupo experimental (SMD:-0,96; IC=95%: -1,85 a -0,07; I<sup>2</sup>:88%; p = 0,03), indicando que o exercício físico reduz as citocinas pró-inflamatórias em pacientes com AVC quando associados dois tipos dos marcadores inflamatórios: IL-6 e TNF- $\alpha$ .

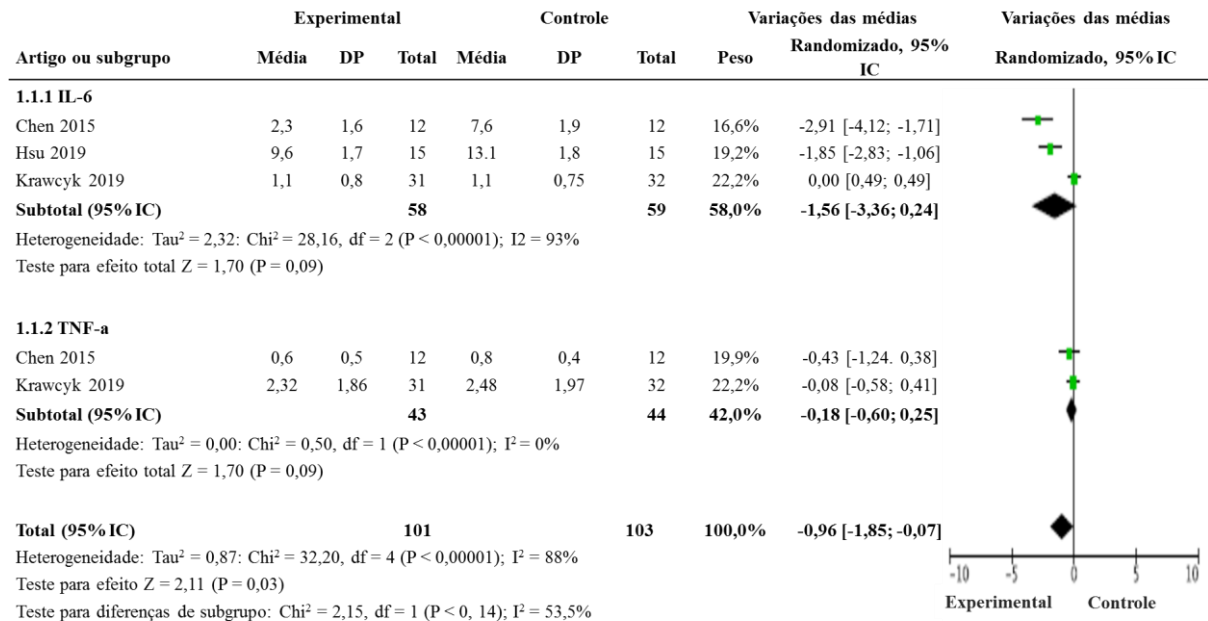


Figura 4: Metanálise funnel plot dos ensaios clínicos randomizados.

Fonte: Elaborado pela autora.

#### 4.1.6 Discussão

No presente estudo observou-se que pacientes com AVC quando submetidos ao exercício físico tiveram redução das citocinas quando associados dois tipos dos marcadores inflamatórios: IL-6 e TNF- $\alpha$ . O exercício físico pós-AVC é capaz de liberar uma grande quantidade de citocinas, consideradas biomarcadores que podem auxiliar no processo de recuperação [5].

Quando avaliado desfechos isolados, foi observado que o exercício físico não foi superior ao grupo controle para reduzir o biomarcador inflamatório IL-6. Este fato pode ser atribuído pelo estudo de Krawcyk et al. [21] ter um tamanho amostral maior que os demais, onde os autores não encontraram diferenças em seus resultados. Esse resultado também pode ser influenciado pelo fato desta interleucina ser liberada após contrações musculares. Ela tem um papel pró-inflamatório robusto, mas paradoxalmente desempenha também um papel anti-inflamatório após o exercício físico [27,28]. Segundo Pedersen [8] a liberação de IL-6 durante o exercício tem vários fatores dependentes, como duração, grupos musculares envolvidos na atividade contrátil e intensidade do exercício, e nos três estudos incluídos na metanálise foram realizados exercícios de grandes grupos musculares, como aeróbicos em bicicleta ergométrica [20,21] e de fortalecimento de músculos de membros inferiores [22].

Quanto ao TNF- $\alpha$ , avaliado apenas nos estudos de Chen et al. e Krawcyk et al. [21,22],

também foi observado que o exercício físico não alterou suas concentrações em pacientes com AVC quando avaliado isoladamente. De acordo com Jin et al. [28] uma das citocinas que atua como neutralizador dos efeitos inflamatórios do TNF- $\alpha$  é a IL-10. E segundo Coelho Júnior et al. e Oliveira [19,27], parece ser liberada pelo músculo durante exercício. Portanto, seria esperado redução nos níveis de TNF- $\alpha$  após o exercício físico, o que foi observado apenas quando os desfechos foram agrupados. No estudo de Chen et al. [22], o TNF- $\alpha$  foi reduzido somente nos exercícios isocinéticos de forma significativa, e Krawczyk et al. [21] mostrou que exercícios de alta intensidade não resultaram em redução desta citocina. Baseado nesses achados, o TNF- $\alpha$  parece ser mais responsivo quando envolve exercícios de força muscular e não de resistência aeróbica.

Após análise qualitativa e quantitativa dos estudos que avaliaram citocinas como biomarcador em pacientes com AVC submetidos ao exercício, é possível observar a baixa quantidade de desfechos associadas à citocinas inflamatórias. Todos os estudos avaliaram a IL-6, possivelmente por ser um biomarcador relacionado a suscetibilidade ao AVC e resposta inflamatória, além do TNF- $\alpha$  [5,29,30]. Além disso, verifica-se uma dificuldade com relação ao tamanho amostral neste tipo de estudo devido fatores de tolerância ao exercício [26], necessidade de medidas de segurança para realizar estas pesquisa em humanos [31], avaliar de forma criteriosa os marcadores inflamatórios, como por exemplo a não existência de doenças inflamatórias, medicamentos em uso, restringindo assim a quantidade de pacientes a serem recrutados.

A maioria dos estudos selecionados realizaram randomização e desfecho seletivo (entre 50% e 75% dos estudos avaliados). Porém, também a maioria, tiveram risco incerto ou alto de viés, reduzindo a qualidade metodológica e nível de evidência disponível. Esta revisão destaca a necessidade de mais estudos com rigor metodológico minimizando os riscos de vieses, principalmente quanto ao domínio de dados incompletos. Sugerimos mais pesquisas referente ao assunto, devido tema promissor no prognóstico dos pacientes com AVC, padronização de coletas de sangue quanto ao período a ser realizado, avaliação dos perfis de citocinas após exercícios tanto em AVC hemorrágico quanto isquêmico, estudos com tamanhos amostrais maiores, participantes de diferentes gravidades, além de exercícios com intensidade, frequência e especificidade diferentes. Portanto, para melhor elucidação sobre o assunto são necessários ensaios clínicos multicêntricos com maior tamanho amostral para elucidar a importância do efeito do exercício físico sobre a alteração de mediadores inflamatórios, como citocinas, produzidas em decorrência do AVC.

#### 4.1.7 Conclusão

A metanálise demonstrou que o exercício físico pode reduzir o nível de citocinas pró-inflamatórias do tipo IL-6 e TNF- $\alpha$ , ou seja, com desfechos combinados, porém, esses estudos têm evidência de moderada a baixa qualidade, além de risco de viés importante. A quantidade de estudos relacionados ao tema ainda é reduzida, embora seja um assunto de tendência atual e de grande importância clínica para pacientes com AVC.

#### 4.1.8 Referências

1. Siniscalchi A, Gallelli L, Malferrari G, Pirritano D, Serra R, Santangelo E, et al. Cerebral stroke injury: the role of cytokines and brain inflammation. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*. 2014;25. doi:10.1515/jbcpp-2013-0121
2. Fang M, Zhong L, Jin X, Cui R, Yang W, Gao S, et al. Effect of Inflammation on the Process of Stroke Rehabilitation and Poststroke Depression. *Front Psychiatry*. 2019;10: 184. doi:10.3389/fpsy.2019.00184
3. King M, Kelly LP, Wallack EM, Hasan SMM, Kirkland MC, Curtis ME, et al. Serum levels of insulin-like growth factor-1 and brain-derived neurotrophic factor as potential recovery biomarkers in stroke. *Neurological Research*. 2019;41: 354–363. doi:10.1080/01616412.2018.1564451
4. Malone K, Amu S, Moore AC, Waeber C. The immune system and stroke: from current targets to future therapy. *Immunol Cell Biol*. 2019;97: 5–16. doi:10.1111/imcb.12191
5. Gandolfi M, Smania N, Vella A, Picelli A, Chirumbolo S. Assessed and Emerging Biomarkers in Stroke and Training-Mediated Stroke Recovery: State of the Art. *Neural Plasticity*. 2017;2017: 1–15. doi:10.1155/2017/1389475
6. Ramiro L, Simats A, García-Berrocso T, Montaner J. Inflammatory molecules might become both biomarkers and therapeutic targets for stroke management. *Ther Adv Neurol Disord*. 2018;11: 175628641878934. doi:10.1177/1756286418789340
7. Martha SR, Cheng Q, Fraser JF, Gong L, Collier LA, Davis SM, et al. Expression of Cytokines and Chemokines as Predictors of Stroke Outcomes in Acute Ischemic Stroke. *Front Neurol*. 2020;10: 1391. doi:10.3389/fneur.2019.01391
8. Pedersen BK. Anti-inflammatory effects of exercise: role in diabetes and cardiovascular disease. *Eur J Clin Invest*. 2017;47: 600–611. doi:10.1111/eci.12781
9. Jiang C, Kong W, Wang Y, Ziai W, Yang Q, Zuo F, et al. Changes in the cellular immune system and circulating inflammatory markers of stroke patients. *Oncotarget*. 2017;8. doi:10.18632/oncotarget.12201
10. Hu Y, Zheng Y, Wu Y, Ni B, Shi S. Imbalance between IL-17A-Producing Cells and

- Regulatory T Cells during Ischemic Stroke. *Mediators of Inflammation*. 2014;2014: 1–8. doi:10.1155/2014/813045
11. Luo Y, Ma H, Zhou J-J, Li L, Chen S-R, Zhang J, et al. Focal Cerebral Ischemia and Reperfusion Induce Brain Injury Through  $\alpha 2\delta$ -1-Bound NMDA Receptors. *Stroke*. 2018;49: 2464–2472. doi:10.1161/STROKEAHA.118.022330
  12. Ryan AS, Li G, Hafer-Macko C, Ivey FM. Resistive Training and Molecular Regulators of Vascular-Metabolic Risk in Chronic Stroke. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*. 2017;26: 962–968. doi:10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2016.11.003
  13. Kurabayashi H, Machida I, Handa H, Yoshida Y, Akiba T, Itoh K, et al. Effects of physical therapy on cytokines and two color analysis-lymphocyte subsets in patients with cerebrovascular diseases. *J Med*. 1999;30: 31–37.
  14. Walsh NP, Gleeson M, Shephard RJ, Gleeson M, Woods JA, Bishop NC, et al. Position statement. Part one: Immune function and exercise. *Exerc Immunol Rev*. 2011;17: 6–63.
  15. Peake JM, Della Gatta P, Suzuki K, Nieman DC. Cytokine expression and secretion by skeletal muscle cells: regulatory mechanisms and exercise effects. *Exerc Immunol Rev*. 2015;21: 8–25.
  16. Langhorne P, Collier JM, Bate PJ, Thuy MN, Bernhardt J. Very early versus delayed mobilisation after stroke. Cochrane Stroke Group, editor. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2018 [cited 2 Dec 2019]. doi:10.1002/14651858.CD006187.pub3
  17. Bernhardt J, Hayward KS, Kwakkel G, Ward NS, Wolf SL, Borschmann K, et al. Agreed definitions and a shared vision for new standards in stroke recovery research: The Stroke Recovery and Rehabilitation Roundtable taskforce. *International Journal of Stroke*. 2017;12: 444–450. doi:10.1177/1747493017711816
  18. Hankey GJ. Stroke. *The Lancet*. 2017;389: 641–654. doi:10.1016/S0140-6736(16)30962-X
  19. Coelho Junior HJ, Gambassi BB, Diniz TA, Fernandes IM da C, Caperuto ÉC, Uchida MC, et al. Inflammatory Mechanisms Associated with Skeletal Muscle Sequelae after Stroke: Role of Physical Exercise. *Mediators of Inflammation*. 2016;2016: 1–19. doi:10.1155/2016/3957958
  20. Hsu C-C, Tsai H-H, Fu T-C, Wang J-S. Exercise Training Enhances Platelet Mitochondrial Bioenergetics in Stroke Patients: A Randomized Controlled Trial. *JCM*. 2019;8: 2186. doi:10.3390/jcm8122186
  21. Steen Krawczyk R, Vinther A, Petersen NC, Faber J, Iversen HK, Christensen T, et al. Effect of Home-Based High-Intensity Interval Training in Patients With Lacunar Stroke: A Randomized Controlled Trial. *Front Neurol*. 2019;10: 664. doi:10.3389/fneur.2019.00664
  22. Chen C-L, Chang K-J, Wu P-Y, Chi C-H, Chang S-T, Cheng Y-Y. Comparison of the Effects between Isokinetic and Isotonic Strength Training in Subacute Stroke Patients. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*. 2015;24: 1317–1323. doi:10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2015.02.002

23. Manolescu BN, Berteanu M, Dumitru L, Dinu H, Iliescu A, Fărcașanu IC, et al. Dynamics of Inflammatory Markers in Post-Acute Stroke Patients Undergoing Rehabilitation. *Inflammation*. 2011;34: 551–558. doi:10.1007/s10753-010-9262-8
24. Charalambous CC, Alcantara CC, French MA, Li X, Matt KS, Kim HE, et al. A single exercise bout and locomotor learning after stroke: physiological, behavioural, and computational outcomes: Effect of exercise on locomotor learning in chronic stroke survivors. *J Physiol*. 2018;596: 1999–2016. doi:10.1113/JP275881
25. Verhagen AP, de Vet HCW, de Bie RA, Kessels AGH, Boers M, Bouter LM, et al. The Delphi List. *Journal of Clinical Epidemiology*. 1998;51: 1235–1241. doi:10.1016/S0895-4356(98)00131-0
26. Sprick JD, Serra MC, Ryan AS, Li Y, Park J. Augmented exercise pressor response during maximal treadmill exercise is not related to systemic inflammation in stroke survivors. *Topics in Stroke Rehabilitation*. 2020; 1–7. doi:10.1080/10749357.2020.1806436
27. Oliveira DMG, Aguiar LT, de Oliveira Limones MV, Gomes AG, da Silva LC, de Morais Faria CDC, et al. Aerobic Training Efficacy in Inflammation, Neurotrophins, and Function in Chronic Stroke Persons: A Randomized Controlled Trial Protocol. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*. 2019;28: 418–424. doi:10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2018.10.016
28. Jin R, Liu L, Zhang S, Nanda A, Li G. Role of Inflammation and Its Mediators in Acute Ischemic Stroke. *J of Cardiovasc Trans Res*. 2013;6: 834–851. doi:10.1007/s12265-013-9508-6
29. Manso H, Krug T, Sobral J, Albergaria I, Gaspar G, Ferro JM, et al. Variants in the Inflammatory *IL6* and *MPO* Genes Modulate Stroke Susceptibility Through Main Effects and Gene—Gene Interactions. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2011;31: 1751–1759. doi:10.1038/jcbfm.2011.27
30. Esenwa CC, Elkind MS. Inflammatory risk factors, biomarkers and associated therapy in ischaemic stroke. *Nat Rev Neurol*. 2016;12: 594–604. doi:10.1038/nrneurol.2016.125
31. Austin MW, Ploughman M, Glynn L, Corbett D. Aerobic exercise effects on neuroprotection and brain repair following stroke: A systematic review and perspective. *Neuroscience Research*. 2014;87: 8–15. doi:10.1016/j.neures.2014.06.007

## 4.2.ARTIGO 2

### TÍTULO: ANÁLISE DE CITOCINAS NA FASE AGUDA DO ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL E SUA ASSOCIAÇÃO ENTRE GRAVIDADE E FORÇA MUSCULAR

#### 4.2.1 Resumo

**Introdução:** Diferentes fases do AVC são caracterizadas por níveis de citocinas que indicam perfis específicos de resposta dos linfócitos T helper e infiltração de leucócitos. Estas citocinas são consideradas como marcadores inflamatórios e seus níveis circulantes podem indicar características desde a patogênese até a neurotoxicidade, remodelação e reparo dos tecidos na lesão cerebral. Porém a contribuição das várias citocinas para a patogênese e gravidade da doença no AVC ainda não está totalmente esclarecida. **Objetivos:** analisar e correlacionar os níveis de citocinas das respostas Th1, Th2, Th17 e Treg e associá-los com a gravidade da doença bem como o nível de força muscular. **Métodos:** Trata-se de um estudo transversal em que foram avaliados pacientes com AVC agudo (n=17) até 72 horas e sujeitos saudáveis controle (n=20). Foram avaliadas força muscular por dinamometria e escala de MRC, e gravidade do quadro neurológico por meio da NIHSS. Os níveis de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 e IL-17A de ambos os grupos foi verificado por meio de coleta de sangue. A comparação dos níveis de citocinas entre os grupos foi feita pelo teste T-student, para variáveis paramétricas e Mann-Whitney, para variáveis não-paramétricas. A associação entre variáveis dependentes e independentes foi realizada a correlação de Pearson e Spearman. As associações estatisticamente significantes foram consideradas se  $p < 0,05$ . **Resultados:** foi observado redução dos níveis séricos de TNF- $\alpha$  e aumento de IL-6 e IL-10 no grupo AVC comparado ao controle. Observamos maior tendência na resposta anti-inflamatória dos pacientes. Além disso, os pacientes apresentaram uma baixa correlação positiva entre os níveis séricos de IL-6 e IL-10. Observou-se associação entre IL12p70 com NIHSS e força de preensão palmar do lado afetado, IL1 $\beta$  com força de preensão palmar do lado afetado e IL6 com força de preensão palmar do lado não-afetado. **Conclusão:** indivíduos com AVC na fase aguda têm predomínio de IL-10 com relação às demais citocinas. indivíduos com AVC na fase aguda têm predomínio de IL-10 com relação às demais citocinas. Os níveis de IL-6, IL-1 $\beta$ , e IL-12 tiveram baixa correlação com força muscular e gravidade do AVC. **Palavras chave:** Acidente vascular cerebral. Biomarcadores. Citocinas. NIHSS. Força muscular. Dinamometria.



## 4.2.2 Introdução

O Acidente Vascular Cerebral (AVC) é uma das principais causas de mortalidade no mundo e a principal causa de incapacidade crônica em adultos [1]. O AVC pode ser classificado em isquêmico (AVCi) ou hemorrágico (AVCh), [2], e é dividido em quatro fases distintas: fase aguda (1-7 dias), subaguda precoce (7 dias a 3 meses), subaguda tardia (3 a 6 meses) e/ou crônica (acima de 6 meses) [3,4], e as alterações mais comuns são: motoras, sensoriais, perceptuais e cognitivas dependendo da área e extensão da lesão [5,6], bem como da resposta inflamatória das primeiras horas do ictus [7].

A resposta imune na fase aguda do AVC é marcada pela necrose do tecido cerebral, quebra de barreira hematoencefálica e liberação de mediadores inflamatórios, o que desencadeia a infiltração de leucócitos no tecido cerebral [7]. Os mediadores inflamatórios como as citocinas e quimiocinas contribuem para diferenciação celular de linfócitos T helper (Th) e o aumento principalmente de células Th17 circulantes [8]. Jiang et al. [9] observaram aumento das citocinas plasmáticas IL-4 (Interleucina-4), IL-6 (Interleucina-6), IL-10 (Interleucina-10), IL-17 (Interleucina-17), IL-23 (Interleucina-23), TGF- $\beta$  (fator de crescimento tumoral beta), no primeiro, terceiro e sétimo dia após AVC.

Os aumentos dos níveis circulantes de algumas destas citocinas foram associados com maior gravidade do quadro neurológico. De acordo com Hu et al.[10], quanto maior os níveis de PCR (proteína C-reativa), IL-6 e IL-23, maior o tamanho da lesão em pacientes com AVCi. No estudo de Lou et al.[11], também foram encontrados níveis séricos aumentados de IL-6 e IL-23, além de níveis aumentados de IL-17, porém observou-se redução de células Treg (T regulatórias), IL-10. Estes níveis aumentados de citocinas do padrão Th17 e, Treg reduzidos, foram relacionadas com danos cerebrais graves em pacientes com AVCi, considerando a função neurológica prejudicada, infarto cerebral, edema tecidual, apoptose e estresse oxidativo. Apesar disto, da IL-6 ter um papel pró-inflamatório robusto, ela também desempenha paradoxalmente um papel benéfico quando liberada após contrações musculares [12,13].

Outros mediadores inflamatórios produzidos na fase aguda do AVC estão associados com pior recuperação funcional. O TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral alfa) foi encontrado aumentado no soro e no líquido cefalorraquidiano em humanos no prazo de 24 horas, uma e duas semanas após o AVC, estando associado à gravidade do comprometimento neurológico [14]. No AVC a redução da massa muscular pode ser observada já nas primeiras 72 horas [15] o que talvez seja influenciado pelo TNF- $\alpha$  que também está envolvido no processo de sarcopenia e aumento da atividade do catabolismo muscular [16]. Este biomarcador inflamatório tanto pode

estar envolvido com piora da lesão quando aumentado, quanto com mecanismos neuroprotetores de lesão cerebral [13].

Levando em consideração as evidências encontradas na literatura, verifica-se que respostas imunes em diferentes tipos de AVC estão envolvidas desde a patogênese dos fatores de risco até a neurotoxicidade, remodelação e reparo dos tecidos na lesão cerebral [17]. Os marcadores inflamatórios como as citocinas e quimiocinas parecem ter um papel promissor para o diagnóstico e prognóstico no AVC [18]. O aumento dos níveis destes marcadores ocorre na circulação sanguínea, no local da lesão e no músculo após o AVC. Porém, não está claro quais os padrões dos níveis de citocinas na fase aguda, bem como a associação destes níveis com a extensão da lesão e repercussão na força muscular [19]. Portanto, o objetivo deste estudo foi analisar os níveis de citocinas produzidas pelas respostas Th1, Th2, Th17 e Treg e associá-los com a gravidade do AVC, bem como com o nível de força muscular. A principal hipótese do nosso estudo é que há aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias na fase aguda e associação com a força muscular e gravidade do AVC.

### **4.2.3 Materiais e métodos**

#### 4.2.3.1 Desenho e local do estudo

Trata-se de um estudo transversal, observacional e com amostra de conveniência com descrição de variáveis quantitativas, no período de Janeiro/2019 a Março/2020, na unidade de pronto socorro adulto e unidade neurológica do Hospital das Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (HC-UFTM).

#### 4.2.3.2 População do estudo

O estudo foi realizado em adultos de ambos os sexos, com idade superior a 18 anos, dividido em duas amostras por conveniência:

a) Grupo AVC: indivíduos internados com até 72h de ictus, de ambos os sexos, acima de 18 anos, com diagnóstico de AVC isquêmico agudo por meio de exame de imagem (tomografia ou ressonância magnética), pontuação maior ou igual a 11 na Escala de coma de Glasgow (ECG), com nível leve a moderado (*National Institute of Health Stroke Scale - NIHSS* < 16). Foram excluídos pacientes com diagnóstico de doença auto-imune após internação hospitalar e infecções até 72 horas. Não foram incluídos pacientes com história de AVC prévio, uso de medicamentos antiinflamatórios esteroidais e não esteroidais.

b) Grupo controle: indivíduos saudáveis, de ambos os sexos, acima de 18 anos, sem histórico de doenças auto-imunes ou neurológicas, sem uso de anti-inflamatórios esteroidais e não esteroidais.

Foi realizada coleta dos dados clínicos e demográficos (gênero e idade), comorbidades, sequelas motoras, , medicações em uso, NIHSS e nível de consciência por meio da ECG.

#### 4.2.3.3 Variáveis

Variáveis descritivas: idade, sexo biológico, fatores de risco, lado comprometido, hábito de vida.

Variáveis dependentes: gravidade do quadro neurológico pela pontuação no NIHSS e força muscular de preensão palmar por meio de dinamometria e escala *Medical Research Council* (MRC).

Variáveis independentes: níveis circulantes das citocinas: TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-8, IL-10, IL-12p70 e IL-17A expressas em picograma por mililitro (pg/ml).

#### 4.2.3.4 Instrumentos utilizados e procedimentos

a) As variáveis descritivas idade, sexo biológico, fatores de risco, lado comprometido, hábito de vida foram coletadas por meio de análise de prontuário eletrônico dos pacientes ou realizadas durante avaliação à beira leito.

b) Escala de coma de Glasgow (ECG): utilizada para descrever o nível de consciência de pacientes com lesão cerebral aguda, em três domínios: abertura ocular, resposta verbal e resposta motora, com pontuação mínima de 3 e máxima de 15 [20].

c) Gravidade do quadro neurológico: Para a avaliação da gravidade do AVC, utilizou-se a escala NIHSS. A escala apresenta 11 itens com pontuação entre 0 a 4, sendo eles: 1.a) Nível de consciência, 1.b) Orientação (idade e mês), 1.c) Comandos (abrir e fechar olhos e apertar e soltar a mão), 2. Motricidade ocular (voluntária ou olhos de boneca), 3. Campos Visuais, 4. Paresia facial, 5. Motor membro superior, 6. Motor membro inferior, 7. Ataxia apendicular, 8.Sensibilidade dolorosa, 9. Linguagem, 10. Disartria, 11. Extinção/negligência. Valores mais altos na escala indicam maior gravidade do AVC [21].

d) Força muscular: foi avaliada por meio da dinamometria de preensão palmar e *Medical Research Council* (MRC).

d.1) Força de preensão palmar: foi testada por meio de um dinamômetro manual

hidráulico JAMAR. A posição para a avaliação foi com o ombro levemente aduzido, o cotovelo fletido a 90°, o antebraço em posição neutra e a posição do punho podendo variar de 0° a 30° de extensão. As instruções foram padronizadas e consistentes. Foram realizadas três medidas e registrado o valor médio entre elas. Considerou-se o tempo de descanso para realização de uma nova medida de 15 segundos. Recomenda-se que 3 segundos de contração máxima sejam o suficiente para registrar a leitura da força de preensão manual, sem causar dessa forma alteração significativa na pressão arterial e frequência cardíaca, o que torna o teste seguro para a maior parte da população [22].

d.2) Classificação da força muscular (MRC): Utiliza notas numéricas de 0 a 5, sendo que grau 0 é quando não tem nem esboço de contração muscular mesmo sem gravidade, grau 1 esboço de contração, grau 2 indica movimento ativo sem gravidade, grau 3 o movimento ativo contra gravidade é possível, grau 4 o movimento ativo contra resistência é possível, grau 5 força normal. São avaliados os movimentos de extensão de punho, flexão de cotovelo, abdução de ombro, flexão de quadril, extensão de joelho e dorsiflexão. A soma total para todos estes movimentos e os quatro membros varia de 0 a 60, sendo quanto maior, melhor a força muscular [23].

#### 4.2.3.5 Variáveis independentes

##### 4.2.3.5.1 *Material biológico*

Para ambos os grupos foram coletadas duas amostras de sangue venoso equivalentes a 20 mL em tubos. O procedimento de coleta sanguínea foi feito em local apropriado nas dependências do HC-UFTM, com material adequado, descartável e realizado por colaborador profissional capacitado e habilitado. O material coletado foi armazenado em temperatura a menos oitenta graus celcius e processado nas dependências do laboratório de Imunologia da Pós-graduação em Medicina Tropical da Universidade federal do Triângulo Mineiro.

Para quantificação dos níveis das citocinas plasmáticas, IL-12p70, IL-1b, IL-8, IL17, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL10, IL-6, IL-4 e IL-2, foi realizada o método de Citometria de fluxo (CBA) (BD Bioscience, San Jose, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Os níveis destas citocinas obtidas por meio deste foram utilizadas para as comparações entre as variáveis independentes e dependentes.

Para quantificação dos níveis das citocinas plasmáticas, IL-10, IL-4, TNF- $\alpha$  e IL-17 e dos receptores TNF-R1 e TNF-R2 foi utilizado o teste ELISA (do inglês “Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay”) (R & D Systems, San Diego, CA, EUA), de acordo com as instruções

do fabricante. Os níveis das citocinas foram expressos em pictogramas por mililitro (pg/mL). Os níveis destas citocinas obtidas por meio deste foram utilizadas para as comparações entre o grupo controle e o grupo de pacientes com AVC.

#### 4.2.3.6 Análise estatística

Foram feitas análises de normalidade por meio do teste Shapiro-Wilk e a análise das variáveis por meio do teste F. As medianas e percentis das amostras não normais ou não paramétricas foram comparadas por meio do teste não paramétrico de Mann-Whitney para comparação entre dois grupos. As médias e desvios padrão das amostras normais e paramétricas foram comparadas por meio do teste paramétrico de T de Student entre dois grupos.

Para correlações dos dados não paramétricos foi utilizado o teste de Spearman. Para correlações dos dados paramétricos foi utilizado o teste de Pearson. O software Graphpad Prism (Graphpad Software 8.3.1, La Jolla, CA, EUA) foi utilizado para o estudo estatístico e construção dos gráficos. Os resultados dos níveis das citocinas foram expressos em picogramas por mililitro (pg/mL).

#### 4.2.4 Implicações éticas

O estudo foi aprovado pelo comitê de ética e pesquisa da Universidade Federal do Triângulo Mineiro em parecer sob o número CAAE:99810818.9.0000.5154. Todos os pacientes cientes da pesquisa foram apresentados e assinaram o Termo de Consentimento livre e esclarecido.

#### 4.2.5 Resultados

Os dados clínicos e demográficos estão demonstrados na tabela 1.

**Tabela 1. Variáveis clínicas e sociodemográficas de pacientes incluídos no estudo (n = 17).**

Variáveis	N	%
Idade	63,94±11,88	
<b>Sexo biológico</b>		
Feminino	5	29,41
Masculino	12	70,58
<b>Fatores de risco</b>		

Diabetes Mellitus	3	17,64
Hipertensão	13	76,47
Cardiopatía	9	52,94
Hipotireoidismo	4	23,52
Depressão	3	17,64
AVC prévio	0	0
<b>Hábitos de vida</b>		
Etilismo	4	23,52
Tabagismo	6	35,29
<b>Variáveis do AVC</b>		
AVC em hemisfério direito	11	64,70
AVC em hemisfério esquerdo	6	35,29
Tempo de avaliação pós AVC (horas) <sup>1</sup>		40,94±18,52
NIHSS		7,59±4,32
<b>Força muscular</b>		
Dinamometria – Lado comprometido		4,25±6,82
Dinamometria – Lado não-comprometido		14,02±10,35
MRC		44,12±12,65

Valores expressos como média e desvio padrão.

Fonte: Elaborado pela autora

Na figura 1 observa-se redução dos níveis TNF- $\alpha$  (gráfico C, T test não pareado,  $p=0,073$ ), e aumento de IL-6 (gráfico G, T test não pareado,  $p<0,0001$ ) e IL-10 (gráfico F, T test não pareado,  $p<0,0001$ ) no grupo AVC quando comparado ao controle saudável. O gráfico H mostra maior tendência na resposta anti-inflamatória dos pacientes com base na verificação da razão das médias entre pacientes e controles das citocinas IL-6 e IL-10. Esta comparação permitiu observar uma resposta de produção de IL-10 predominante sobre a IL-6.

Quando comparados por teste de correlação (figura 2), os pacientes apresentaram uma baixa correlação positiva entre os níveis de IL-6 e IL-10 (Sperman test,  $p=0,03$ ,  $r=0,494$ ). Porém não foram verificadas correlações entre tempo pós AVC (*onset*) e IL-6 (Sperman test,  $p=0,204$ ,  $r=0,323$ ) e IL-10 (Sperman test,  $p=0,801$ ,  $r=0,063$ ).

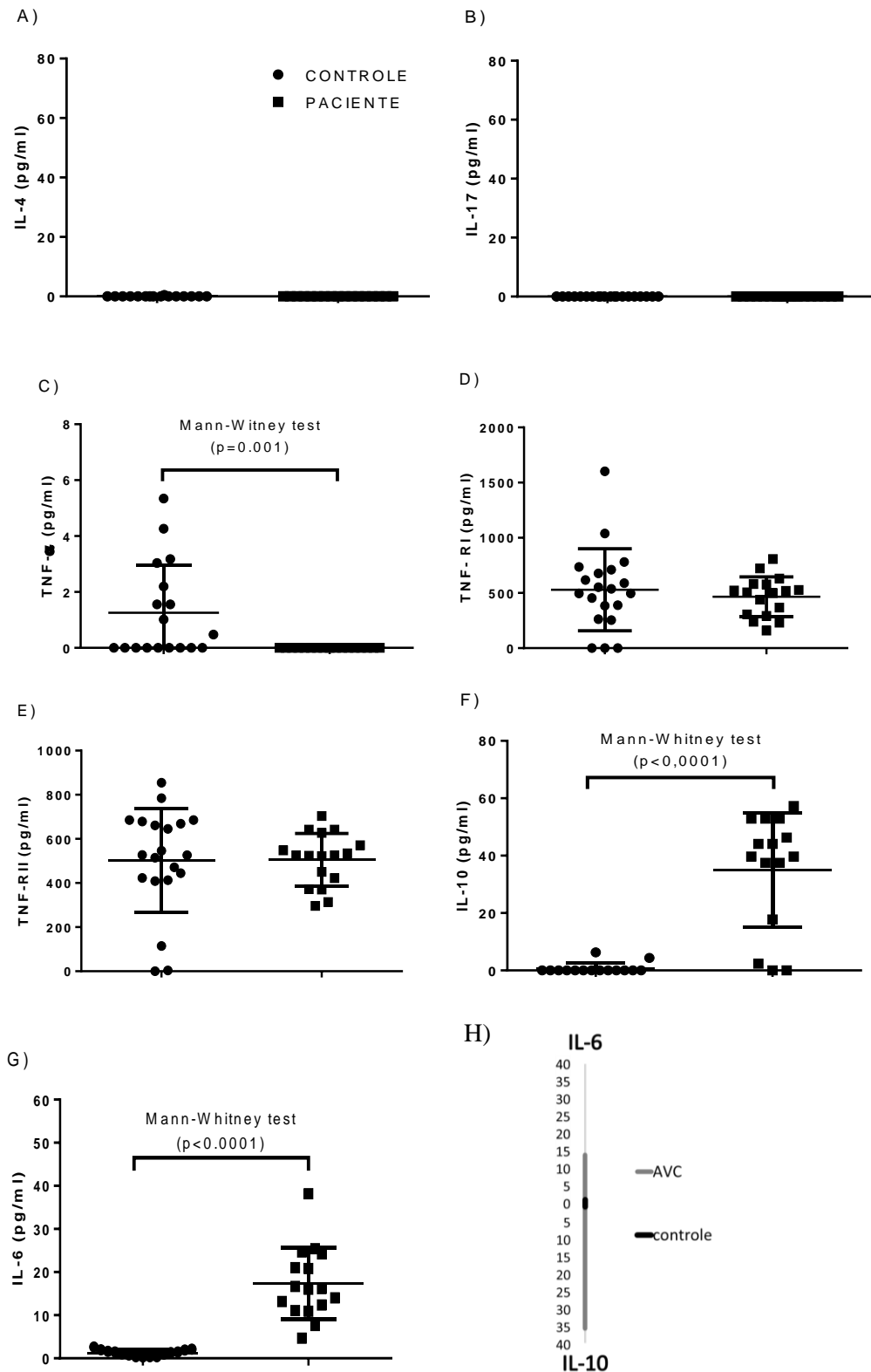


Figura 1: Gráficos de comparações entre os valores dos níveis de citocinas séricas, e receptores séricos de controles e pacientes (AVC). O eixo do grupo controle está representado pelos valores individuais ilustrados por círculos sólidos. O eixo do grupo AVC (pacientes) está representado pelos valores individuais ilustrados por quadrados sólidos. As comparações com resultados significantes ( $p<0,05$ ) estão representadas com chaves e valores de “p” específicos. O gráfico H mostra a representação entre a razão das médias dos níveis séricos de IL-6 e IL-10 dos pacientes e controles. O ponto negro é a linha de base dos valores. A linha cinza representa o valor do cálculo da razão entre os valores das respectivas citocinas de pacientes e controles.  
Fonte: Elaborado pela autora.

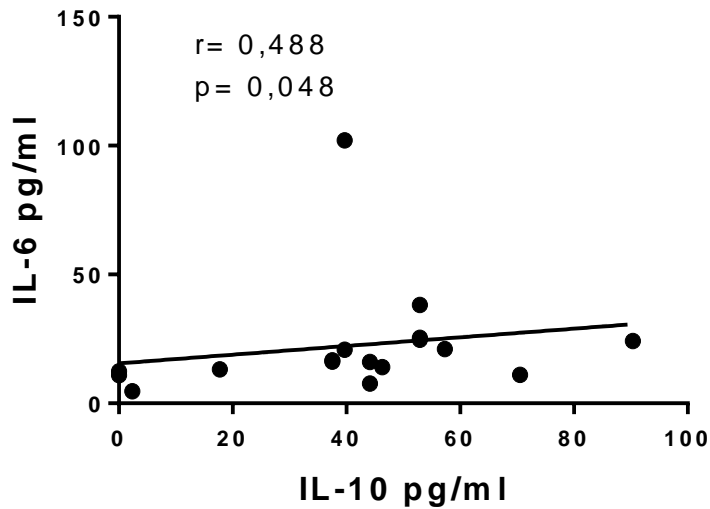


Figura 2: Correlação entre os valores dos níveis séricos de citocinas (IL-6/IL-10) do grupo AVC (pacientes). Os valores individuais dos níveis das citocinas estão representados por círculos sólidos. Valores significativos considerados de  $p < 0,05$ , Spearman test). Os valores dos níveis de citocinas estão representados por pictogramas por mililitro (pg/ml).

Fonte: Elaborado pela autora.

As associações entre idade, tempo do ictus, NIHSS, força muscular global e força muscular de preensão palmar do lado afetado e não-afetado com as citocinas, dos pacientes com AVC, estão demonstradas na figura 3. Foi observado associação estatisticamente significante entre IL12p70 com NIHSS ( $r = -0.50$ ;  $p = 0.03$ ) e força de preensão palmar do lado afetado ( $r = 0.52$ ;  $p = 0.02$ ). Também foi observado associação estatisticamente significante entre IL-1 $\beta$  com força de preensão palmar do lado afetado ( $r = 0.74$ ;  $p = 0.001$ ) e IL-6 com força de preensão palmar do lado não-afetado ( $r = -0.44$ ;  $p = 0.04$ ). Não houveram associações estatisticamente significante entre as demais citocinas.



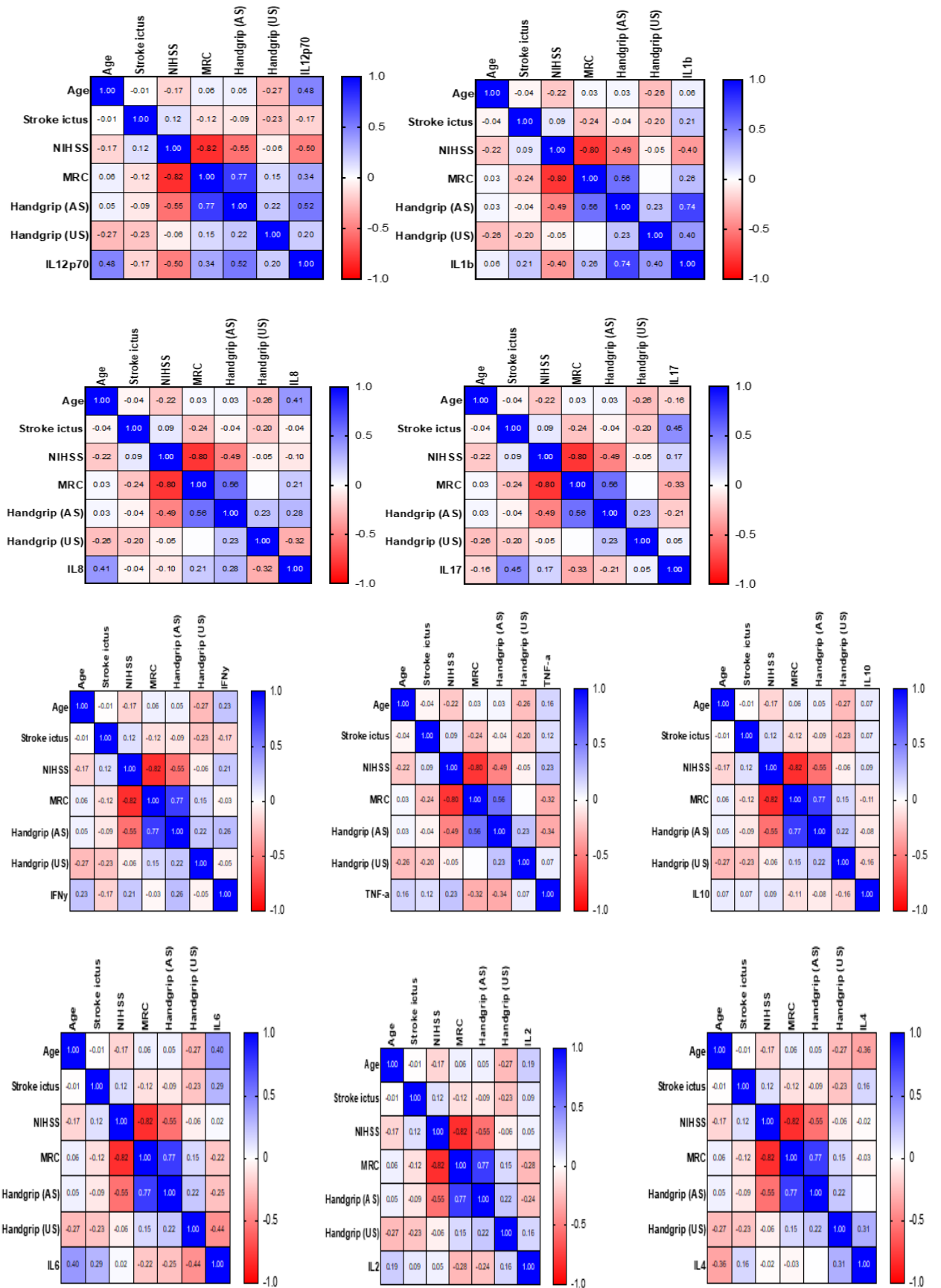


Figura 3: Matriz de correlação entre variáveis independentes e dependentes. O degradê de cores indica a força de correlação (quanto mais azul maior a correlação positiva e quanto mais vermelha maior a correlação negativa).  
 Fonte: Elaborado pela autora.

#### 4.2.6 Discussão

Os Principais achados desse estudo foram redução dos níveis séricos de TNF- $\alpha$  e aumento de IL-6 e IL-10 nos pacientes com AVC quando comparados aos controles. Os níveis de IL-10 parecem estar predominantes e se correlacionaram com os níveis de IL-6, indicando uma maior tendência na resposta anti-inflamatória. Também foi observado associação negativa entre IL-12p70 com gravidade do AVC e positiva com a força de preensão palmar do lado afetado. Além disso, observou-se associação positiva entre IL-1 $\beta$  com força de preensão palmar do lado afetado e negativa entre IL-6 com força de preensão palmar do lado não-afetado.

Nossos resultados inicialmente indicam que os níveis séricos de algumas citocinas podem estar associados com alterações desencadeadas pelo AVC mensuradas por meio do NIHSS e teste de força, portanto consideradas biomarcadores. As associações de biomarcadores com a gravidade e prognóstico de pacientes com AVC desencadearam novas perspectivas de avaliação e tratamentos. Dentre estes estudos, muitos abordam especificamente a provável atuação das citocinas na lesão e recuperação do AVC [7,8,9,10,18]. As citocinas também participam do processo de enfraquecimento muscular no AVC por ações diretas no processo de catabolismo muscular [14,16,19].

A associação negativa da citocina IL-12p70 com a gravidade do AVC (NIHSS) foi estatisticamente significante neste estudo. Esta interleucina tem papel considerado pró-inflamatório e é produzida em resposta a patógenos microbianos. A consideração do seu papel pró-inflamatório está baseado nas evidências na estimulação e a diferenciação de células Th1 e na produção de IFN- $\gamma$  [24]. Não foram verificcados estudos que mostraram a importância da IL-12 no AVC. Com base na ação específica da IL-12 e a escassez de estudos, não podemos no momento associar nossos resultados a algum mecanismo fisiopatológico. Porém, este resultado abre margem para futuros estudos que possam verificar a associação desta citocina com um suposto papel neuroprotetor na fase aguda do AVC, visto que maiores níveis de IL-12 estiveram associados a menores pontuações no NIHSS.

Uma associação positiva foi encontrada entre IL-1 $\beta$  com força de preensão palmar do lado afetado. A IL-1 $\beta$  faz parte de uma família de citocinas envolvidas em processos pró-inflamatórios. Esta citocina é produzida por macrófagos ativados e células epiteliais. Ligada em seu receptor tipo 1 (IL-1R tipo I) ativa proliferação, diferenciação e apoptose celular. Como função específica ativa proteínas endoteliais para migração celular [25,26]. Além disso, a IL-1 induz a expressão de outras citocinas inflamatórias no Sistema Nervoso Central (SNC) através microglia e células endoteliais [27]. Este papel central da IL-1 na via pró-inflamatória no SNC

pode acarretar no aumento local de citocinas. O aumento local e/ou sistêmico da IL-1 não explica a relação dos seus níveis aumentados com a força de preensão palmar.

Os níveis de IL-6 tiveram uma associação inversamente proporcional com a força de preensão palmar, porém do lado não-afetado. A IL-6 está associada a diversos eixos principalmente pró-inflamatórios. Sua produção pode ser evidenciada tanto na estimulação de linfócitos, incluindo leucócitos do padrão Th17 [28] e TH22 [29] quanto por células do tecido adiposo, muscular e epitelial [30]. Seus níveis aumentados na circulação estão associados a efeitos inflamatórios sistêmicos deletérios [31]. Porém, ela pode estar associada sistemicamente a recuperação de alguns tecidos como o do próprio sistema muscular e ósseo após atividade física [32]. A relação inversamente proporcional da IL-6 em relação a força do lado não afetado não pode ser explicada aqui ou mesmo exemplificada por meio de estudos relacionados devido a diversidade imunológica da IL-6. Porém, uma provável relação entre IL-6, IL-1 $\beta$  e IL-12 deve ser considerada em futuros estudos de nosso grupo. Isto porque estas citocinas são consideradas como biomarcadores associados a ações neuroimunoendócrinas ou mesmo indicadoras de infecções bacterianas [33].

A IL-6 participa da neurogênese e estimula neurônios maduros e células gliais em condições normais e em modelos de lesão do SNC. Assim, o efeito desta citocina no SNC é comparado a neurotrofina e é um alvo claro de terapias estratégicas [34]. Porém, assim como a IL-10, o papel da IL-6 no SNC, sobretudo na fase aguda do AVC, não está bem definido. Níveis mais elevados desta citocina foram associados a um menor tempo de sobrevivência [35]. Em contrapartida, o uso da IL-6 em modelos de isquemia mostrou ser promissor e foi associado a um efeito benéfico associado a incapacidade de afetar o volume do infarto em camundongos C57BL/6, na fase aguda e reduziu o volume do infarto em camundongos knockout para IL-6. Além disso, este mesmo estudo evidenciou que após 45 minutos da administração de IL-6 nos camundongos C57BL/6 houve maiores níveis plasmáticos de IL-10 [36].

A associação do IL-10 com algum mecanismo protetor é corroborada por intervenções como técnicas de hipotermia seletiva que ativa a produção do BDNF e da IL-10 no baço, mostrando a ação sistêmica de um eixo neuroimunológico considerado protetivo para um melhor prognóstico [37]. Este papel protetivo da IL-10 no AVC é confrontado por estudos que associam um aumento desta citocina com uma imunossupressão pós-AVC, que piora os resultados da recuperação do paciente tanto em fase aguda como a longo prazo. Porém, isto parece ser verdade apenas para pacientes do sexo feminino [38]. A IL-10 também é relacionada a um efeito negativo quando considerado seus níveis aumentados associados as taxas de mortalidade nos primeiros 30 dias [39]. De acordo com estes estudos ainda não há um consenso

do papel da IL-10 no AVC. Porém, pode ser que polimorfismos na IL-10 e IL-6 corroborem para a suscetibilidade do AVC, gerando ainda mais discussões da verdadeira função desta citocina no SNC durante a fase inicial da lesão [40].

Apesar desta incógnita sobre a função da IL-10 no AVC, é fato que sobre vias fisiológicas esta citocina tem um importante papel anti-inflamatório incluindo o SNC, como mostrado por Zhou et al. [41]. Neste estudo foi mostrado que a deleção de Tregs aumentou a deficiência neurológica associados a inflamação e degeneração neuronal. E o contrário também foi visto. O mais interessante nestas evidências em modelos animais foi que, a depleção de Tregs, e consequente interrupção da produção de IL-10 local, mudou a diferenciação da microglia/macrófago em direção ao fenótipo M1 (considerado mais inflamatório), enquanto o que a indução no aumento de Tregs mudou essa diferenciação em direção ao fenótipo M2 (considerado com menor ação inflamatória). Nosso estudo corrobora com a literatura em relação aos níveis de IL-10 circulantes na fase aguda [39,42,43].

Portanto, com base na literatura vigente e nossos resultados podemos verificar que há uma forte produção de IL-10 na fase aguda, e esse aumento pode ser causado como mecanismo modulador da inflamação local durante o processo isquêmico, que pode ser percebido sistemicamente por meio da circulação desta citocina produzida no próprio cérebro por células Tregs e/ou micróglia e/ou por linfócitos em órgão linfoides secundários (linfonodos e baço). Nossos resultados corroboram com a maior parte da literatura que afirma o aumento dos níveis de IL-6 na fase aguda de pacientes com AVC [31,44,45]. Além disso, pudemos verificar que os níveis de IL-10 estão correlacionados aos níveis de IL-6 circulantes. Com base na literatura e nestes resultados de nosso estudo podemos considerar que a IL-6 pode estar estimulando a produção de IL-10 no SNC e/ou sistemicamente. Com base nos resultados da IL-10 é necessário em futuros estudos, verificar vias anti-inflamatórias como potenciais barreiras químicas que torna o SNC imunoprivilegiado.

#### **4.2.7 Conclusão**

Neste estudo, concluímos que pacientes com AVC na fase aguda, possuem níveis séricos de IL-10 aumentados sobrepujando os demais níveis de citocinas. Estes níveis de IL-10 não estão associados a gravidade do AVC e força muscular. Já os níveis de IL-6, IL-1 $\beta$ , e IL-12 tiveram baixa correlação com força muscular. E correlação negativa baixa com a gravidade do AVC, apenas a IL-12. Devido a baixa correlação entre as variáveis, concluímos a necessidade de um tamanho amostral maior para melhores evidências em novos estudos com

as citocinas citadas. É necessário também que seja realizada comparação das citocinas de IL-6, IL-1 $\beta$  e IL-12 com pacientes saudáveis para melhor investigação.

#### 4.2.8 Referências

1. Bernhardt J, Zorowitz RD, Becker KJ, Keller E, Saposnik G, Strbian D, et al. Advances in Stroke 2017. *Stroke*. 2018;49. doi:10.1161/STROKEAHA.118.021380
2. Hankey GJ. Stroke. *The Lancet*. 2017;389: 641–654. doi:10.1016/S0140-6736(16)30962-X
3. Langhorne P, Wu O, Rodgers H, Ashburn A, Bernhardt J. A Very Early Rehabilitation Trial after stroke (AVERT): a Phase III, multicentre, randomised controlled trial. *Health Technol Assess*. 2017;21: 1–120. doi:10.3310/hta21540
4. Bernhardt J, Hayward KS, Kwakkel G, Ward NS, Wolf SL, Borschmann K, et al. Agreed definitions and a shared vision for new standards in stroke recovery research: The Stroke Recovery and Rehabilitation Roundtable taskforce. *International Journal of Stroke*. 2017;12: 444–450. doi:10.1177/1747493017711816
5. Scherbakov N, von Haehling S, Anker SD, Dirnagl U, Doehner W. Stroke induced Sarcopenia: Muscle wasting and disability after stroke. *International Journal of Cardiology*. 2013;170: 89–94. doi:10.1016/j.ijcard.2013.10.031
6. Rafii MS, Hillis AE. Compendium of cerebrovascular diseases. *International Review of Psychiatry*. 2006;18: 395–407. doi:10.1080/09540260600935405
7. Ramiro L, Simats A, García-Berrocoso T, Montaner J. Inflammatory molecules might become both biomarkers and therapeutic targets for stroke management. *Ther Adv Neurol Disord*. 2018;11: 175628641878934. doi:10.1177/1756286418789340
8. Dolati S, Ahmadi M, Khalili M, Taheraghdam AA, Siahmansouri H, Babaloo Z, et al. Peripheral Th17/Treg imbalance in elderly patients with ischemic stroke. *Neurol Sci*. 2018;39: 647–654. doi:10.1007/s10072-018-3250-4
9. Jiang C, Kong W, Wang Y, Ziai W, Yang Q, Zuo F, et al. Changes in the cellular immune system and circulating inflammatory markers of stroke patients. *Oncotarget*. 2017;8. doi:10.18632/oncotarget.12201
10. Hu Y, Zheng Y, Wu Y, Ni B, Shi S. Imbalance between IL-17A-Producing Cells and Regulatory T Cells during Ischemic Stroke. *Mediators of Inflammation*. 2014;2014: 1–8. doi:10.1155/2014/813045
11. Lou Z, Wang A-P, Duan X-M, Hu G-H, Song G-L, Zuo M-L, et al. Upregulation of NOX2 and NOX4 Mediated by TGF- $\beta$  Signaling Pathway Exacerbates Cerebral Ischemia/Reperfusion Oxidative Stress Injury. *Cell Physiol Biochem*. 2018;46: 2103–2113. doi:10.1159/000489450
12. Oliveira DMG, Aguiar LT, de Oliveira Limones MV, Gomes AG, da Silva LC, de Moraes Faria CDC, et al. Aerobic Training Efficacy in Inflammation, Neurotrophins, and Function in Chronic Stroke Persons: A Randomized Controlled Trial Protocol. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*. 2019;28: 418–424. doi:10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2018.10.016

13. Jin R, Liu L, Zhang S, Nanda A, Li G. Role of Inflammation and Its Mediators in Acute Ischemic Stroke. *J of Cardiovasc Trans Res.* 2013;6: 834–851. doi:10.1007/s12265-013-9508-6
14. Zaremba J, Losy J. Early TNF-alpha levels correlate with ischaemic stroke severity. *Acta Neurol Scand.* 2001;104: 288–295. doi:10.1034/j.1600-0404.2001.00053.x
15. Jorgensen L, Jacobsen BK. Changes in muscle mass, fat mass, and bone mineral content in the legs after stroke: a 1 year prospective study. *Bone.* 2001;28: 655–659. doi:10.1016/S8756-3282(01)00434-3
16. Costamagna D, Costelli P, Sampaolesi M, Penna F. Role of Inflammation in Muscle Homeostasis and Myogenesis. *Mediators of Inflammation.* 2015;2015: 1–14. doi:10.1155/2015/805172
17. Malone K, Amu S, Moore AC, Waeber C. The immune system and stroke: from current targets to future therapy. *Immunol Cell Biol.* 2019;97: 5–16. doi:10.1111/imcb.12191
18. Gandolfi M, Smania N, Vella A, Picelli A, Chirumbolo S. Assessed and Emerging Biomarkers in Stroke and Training-Mediated Stroke Recovery: State of the Art. *Neural Plasticity.* 2017;2017: 1–15. doi:10.1155/2017/1389475
19. Coelho Junior HJ, Gambassi BB, Diniz TA, Fernandes IM da C, Caperuto ÉC, Uchida MC, et al. Inflammatory Mechanisms Associated with Skeletal Muscle Sequelae after Stroke: Role of Physical Exercise. *Mediators of Inflammation.* 2016;2016: 1–19. doi:10.1155/2016/3957958
20. Brennan PM, Murray GD, Teasdale GM. Simplifying the use of prognostic information in traumatic brain injury. Part 1: The GCS-Pupils score: an extended index of clinical severity. *J Neurosurg.* 2018;128: 1612–1620. doi:10.3171/2017.12.JNS172780
21. Cincura C, Pontes-Neto OM, Neville IS, Mendes HF, Menezes DF, Mariano DC, et al. Validation of the National Institutes of Health Stroke Scale, modified Rankin Scale and Barthel Index in Brazil: the role of cultural adaptation and structured interviewing. *Cerebrovasc Dis.* 2009;27: 119–122. doi:10.1159/000177918
22. Bohannon RW, Peolsson A, Massy-Westropp N, Desrosiers J, Bear-Lehman J. Reference values for adult grip strength measured with a Jamar dynamometer: a descriptive meta-analysis. *Physiotherapy.* 2006;92: 11–15. doi:10.1016/j.physio.2005.05.003
23. *Aids to the examination of the peripheral nervous system.* London: H. M. S. O; 1976.
24. Vignali DAA, Kuchroo VK. IL-12 family cytokines: immunological playmakers. *Nat Immunol.* 2012;13: 722–728. doi:10.1038/ni.2366
25. Lee JG, Heur M. Interleukin-1 $\beta$  enhances cell migration through AP-1 and NF- $\kappa$ B pathway-dependent FGF2 expression in human corneal endothelial cells. *Biology of the Cell.* 2013;105: 175–189. doi:10.1111/boc.201200077
26. Issekutz AC, Issekutz TB. Quantitation and kinetics of blood monocyte migration to acute inflammatory reactions, and IL-1 alpha, tumor necrosis factor-alpha, and IFN-gamma. *J Immunol.* 1993;151: 2105–2115.
27. Zhu L, Liu X, Nemeth DP, DiSabato DJ, Witcher KG, Mckim DB, et al. Interleukin-1 causes CNS inflammatory cytokine expression via endothelia-microglia bi-cellular signaling. *Brain, Behavior, and Immunity.* 2019;81: 292–304. doi:10.1016/j.bbi.2019.06.026

28. Kimura A, Kishimoto T. IL-6: Regulator of Treg/Th17 balance. *Eur J Immunol.* 2010;40: 1830–1835. doi:10.1002/eji.201040391
29. Zenewicz LA, Flavell RA. Recent advances in IL-22 biology. *International Immunology.* 2011;23: 159–163. doi:10.1093/intimm/dxr001
30. Kim OY, Chung JY, Song J. Effect of resveratrol on adipokines and myokines involved in fat browning: Perspectives in healthy weight against obesity. *Pharmacological Research.* 2019;148: 104411. doi:10.1016/j.phrs.2019.104411
31. Sun B, Liang L, Li J, Yang D, Zhao X, Zhang K. A meta-analysis of interleukin-6 as a valid and accurate index in diagnosing early neonatal sepsis. *Int Wound J.* 2019;16: 527–533. doi:10.1111/iwj.13079
32. Turner JD, Naylor AJ, Buckley C, Filer A, Tak P-P. Fibroblasts and Osteoblasts in Inflammation and Bone Damage. In: Owens BMJ, Lakins MA, editors. *Stromal Immunology.* Cham: Springer International Publishing; 2018. pp. 37–54. doi:10.1007/978-3-319-78127-3\_3
33. Bauer ME, Rocha NP, Savino W, Teixeira AL. Immune Mechanisms Affecting the Functioning of the Central Nervous System (CNS). *Immunopsychiatry.* Oxford University Press; 2018. pp. 47–64. doi:10.1093/med/9780190884468.003.0003
34. Erta M, Quintana A, Hidalgo J. Interleukin-6, a Major Cytokine in the Central Nervous System. *Int J Biol Sci.* 2012;8: 1254–1266. doi:10.7150/ijbs.4679
35. Mengel A, Ulm L, Hotter B, Harms H, Piper SK, Grittner U, et al. Biomarkers of immune capacity, infection and inflammation are associated with poor outcome and mortality after stroke - the PREDICT study. *BMC Neurol.* 2019;19: 148. doi:10.1186/s12883-019-1375-6
36. Gronhoj MH, Clausen BH, Fenger CD, Lambertsen KL, Finsen B. Beneficial potential of intravenously administered IL-6 in improving outcome after murine experimental stroke. *Brain, Behavior, and Immunity.* 2017;65: 296–311. doi:10.1016/j.bbi.2017.05.019
37. Corey S, Abraham DI, Kaneko Y, Lee J-Y, Borlongan CV. Selective endovascular cooling for stroke entails brain-derived neurotrophic factor and splenic IL-10 modulation. *Brain Research.* 2019;1722: 146380. doi:10.1016/j.brainres.2019.146380
38. Conway SE, Roy-O'Reilly M, Friedler B, Staff I, Fortunato G, McCullough LD. Sex differences and the role of IL-10 in ischemic stroke recovery. *Biol Sex Differ.* 2015;6: 17. doi:10.1186/s13293-015-0035-9
39. Chang L-T, Yuen C-M, Liou C-W, Lu C-H, Chang W-N, Youssef AA, et al. Link between Interleukin-10 Level and Outcome after Ischemic Stroke. *Neuroimmunomodulation.* 2010;17: 223–228. doi:10.1159/000290038
40. Chen M, Yang Y. A meta-analysis on associations of IL-6 and IL-10 polymorphisms with susceptibility to ischemic stroke. *Journal of Neuroimmunology.* 2019;335: 577004. doi:10.1016/j.jneuroim.2019.577004
41. Zhou K, Zhong Q, Wang Y-C, Xiong X-Y, Meng Z-Y, Zhao T, et al. Regulatory T cells ameliorate intracerebral hemorrhage-induced inflammatory injury by modulating microglia/macrophage polarization through the IL-10/GSK3 $\beta$ /PTEN axis. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2017;37: 967–979. doi:10.1177/0271678X16648712
42. Nayak AR, Kashyap RS, Purohit HJ, Kabra D, Taori GM, Dagainawala HF. Evaluation of the

inflammatory response in sera from acute ischemic stroke patients by measurement of IL-2 and IL-10. *Inflamm Res.* 2009;58: 687–691. doi:10.1007/s00011-009-0036-4

43. Kulesh AA, Kuklina EM, Shestakov VV. The relationship between serum and liquor IL-1 $\beta$ , IL-6, tnf $\alpha$ , IL-10 levels and clinical, cognitive and functional characteristics in acute ischemic stroke. *Klin Med (Mosk)*. 2016;94: 657–662.

44. Wytrykowska A, Proszka-Mackiewicz M, Nyka WM. IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and IL-6 levels in gingival fluid and serum of patients with ischemic stroke. *Journal of Oral Science*. 2016;58: 509–513. doi:10.2334/josnusd.16-0278

45. Lasek-bal, A; The importance of selected markers of inflammation and blood-brain barrier damage for short-term ischemic stroke prognosis. *Journal of Physiology and Pharmacology*. 2019 [cited 28 Nov 2020]. doi:10.26402/jpp.2019.2.04



## 5 CONCLUSÃO

São necessários mais estudos abordando o tema exercícios em pacientes com AVC com avaliação de citocinas devido a quantidade reduzida e com baixo nível de evidência, apesar da nossa metanálise indicar que o exercício físico reduz os níveis de citocinas. E estudos que verifiquem citocinas em pacientes com AVC em fase aguda. Neste, concluímos que os níveis de IL-10 são maiores que as demais citocinas e que os níveis de IL-6, IL-1 $\beta$ , e IL-12 tiveram baixa correlação com força muscular. E apenas a IL-12 teve correlação negativa baixa com a gravidade do AVC.

## REFERÊNCIAS

- ARAUJO-PIRES, A.C.; FRANCISCONI, C.F.; BIGUETTI, C.C.; CAVALLA F., ARANHA, A.M.; LETRA, A., TROMBONE, A.P.; FAVERI, M., SILVA, R.M., GARLET, G.P. Simultaneous analysis of T helper subsets (Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, Tfh, Tr1 and Tregs) markers expression in periapical lesions reveals multiple cytokine clusters accountable for lesions activity and inactivity status. **J Appl Oral Sci.** Jul-Aug; v.22,n.4, p:336-46. 2014.
- DINARELLO, C.A. Historical Review of Cytokines. **Eur J Immunol.** Nov; v.37, Suppl 1, p: S34–S45. 2007.
- GEORGE, P.M., BADIGER, R.; ALAZAWI W.; FOSTER, G.R., MITCHELL, J.A. Pharmacology and therapeutic potential of interferons. **Pharmacol Ther.** Jul; v.135,n.1, p:44-53. 2012.
- GERY, I., WAKSMAN, B.H. Potentiation of the T-lymphocyte response to mitogens. II. The cellular source of potentiating mediator(s). **J Exp Med.** Jul 1; v.136,n.1, p:143-55. 1972
- Guidelines for the Early Management of Patients With Acute Ischemic Stroke (GEMPAS): A Guideline for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. **Stroke** 2018. Acesso em: Mar/2018.
- HACKE W, et al. "Thrombolysis with Alteplase 3 to 4.5 Hours after Acute Ischemic Stroke". **The New England Journal of Medicine.** v.359, n.13, p:1317-1329. 2008.
- ISAACS, A., LINDENMANN, J. Virus interference. I. The interferon. **Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.**, v.147, p. 258.267. 1957.
- MALONE K, AMU S, MOORE AC, WAEBER C. The immune system and stroke: from current targets to future therapy. **Immunol Cell Biol.** 2019;97: 5–16. doi:10.1111/imcb.12191.
- MARLER, J.R., et al. "Tissue Plasminogen Activator for Acute Ischemic Stroke". **The New England Journal of Medicine.** V.333, n.24, p:1581-1587. 1995.
- MEHTA, R.H., EAGLE, K.A. Secondary prevention in acute myocardial infarction. **BMJ.** v.316, p:838-42. 1998.
- PORTAL MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Ministério da Saúde.** Disponível em: ]~/http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/acidente-vascular-cerebral-avc. Acesso em: Abril/2018.
- RAMIRO L, SIMATS A, GARCÍA-BERROCOSO T, MONTANER J. Inflammatory molecules might become both biomarkers and therapeutic targets for stroke management. **Ther Adv Neurol Disord.** 2018;11: 175628641878934. doi:10.1177/1756286418789340.
- SCHWARTZ, D.M.; BONELLI, M.; GADINA, M., O'SHEA, J.J. Type I/II cytokines, JAKs, and new strategies for treating autoimmune diseases. **Nat Rev Rheumatol.** Jan; v.12, n.1, p:25-36. 2016.

WHEELOCK, E.F. Interferon-like virus-inhibitor induced in human leukocytes by phytohemagglutinin. **Science**. Jul 16;v.149,n.3681, p:310-1. 1965.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, **WORLD HEALTH ORGANIZATION**.  
Disponível em: [http://www.who.int/cardiovascular\\_diseases/world-heart-day-2017/en/](http://www.who.int/cardiovascular_diseases/world-heart-day-2017/en/).  
Acesso em: Mar/2018.