

UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PELOTAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E COMPORTAMENTO

ISABELA THUROW LEMES

**SORO DERIVADO DE PACIENTES COM AVC MODULA PARÂMETROS
REDOX E INFLAMATÓRIOS EM CÉLULAS ASTROGLIAIS**

Pelotas

2024

ISABELA THUROW LEMES

**SORO DERIVADO DE PACIENTES COM AVC MODULA PARÂMETROS
REDOX E INFLAMATÓRIOS EM CÉLULAS ASTROGLIAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Comportamento da Universidade Católica de Pelotas como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Saúde e Comportamento.

Orientador: Prof. Dr. Adriano Martimbianco de Assis

Pelotas

2024

Ficha catalográfica

Lemes, Isabela Thrurow

Soro derivado de pacientes com AVC modula parâmetros redox e inflamatórios em células astrogliais. / Isabela Thrurow Lemes. - Pelotas: UCPEL, 2025.

96 f.

Orientador: Adriano Martimbianco de Assis.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Católica de Pelotas, Programa de Pós-Graduação em Saúde e Comportamento. - Pelotas, BR-RS, 2025.

1. Astrócito. 2. Acidente vascular cerebral. 3. Neuroinflamação. 4. Estresse oxidativo. I. Assis, Adriano Martimbianco. III. Título.

Bibliotecária responsável: Cristiane de Freitas Chim CRB 10/1233

**SORO DERIVADO DE PACIENTES COM AVC MODULA PARÂMETROS
REDOX E INFLAMATÓRIOS EM CÉLULAS ASTROGLIAIS**

Conceito final: aprovado

Aprovado em: 28 de novembro de 2024.

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a. Dr^a. Roselia Maria Spanevello - Universidade Federal de Pelotas (UFPel)

Prof^a. Dr^a. Fernanda Pedrotti Moreira - Universidade Católica de Pelotas (UCPel)

Orientador – Prof. Dr. Adriano Martimbianco de Assis - Universidade Católica de
Pelotas (UCPel)

Agradecimento

Acredito que tudo o que somos, devemos à família. No meu caso, além da família biológica, também a acadêmica. Não tenho por costume citar nomes, por isso, deixo aqui meus sinceros agradecimentos àqueles que saberão qual a sua parte neste texto e na minha vida.

Aos meus pais, por após tanto esforço, conseguirem me formar quem e como sou hoje. À eles, que são minha ponte com o passado e o motivo pelo qual eu luto pelo futuro, juntamente com minha irmã que vibra por mim independente da distância, são a quem devo e dedico conquista.

Ao meu companheiro de vida, que forma comigo o início da nossa família e me ampara todos os dias para que eu possa buscar pelo que almejo. Obrigada por sonhar comigo.

À minha irmã acadêmica, que ao meu lado vive a rotina, enfrenta as dificuldades, comemora as vitórias, partilha da vida e do mais genuíno e leve companheirismo pra se ser quem se é. És um dos presentes mais valiosos que a vida me deu.

Ao meu orientador, que me ensinou o gosto pela ciência ao longo destes sete anos de trajetória acadêmica, acolheu com paciência e proporcionou a oportunidade de chegar até aqui, sempre torcendo pelo melhor. Agradeço pelo vínculo construído e admiro por tudo que foi e ainda será aprendido.

Ao Laboratório de Neurociências Clínicas, ao NUPENN e aos companheiros de grupo, que moveram este trabalho e os dias junto comigo, fazendo com que o aprendizado e tudo o que se passou em todos estes anos fossem preenchidos de muita alegria e amizade. Sem vocês nada disso teria o menor sentido.

Este foi um trabalho feito a muitas mãos. Todas elas, sem excessão, essenciais para que este documento existisse e, junto a ele, ótimas memórias.

RESUMO

Introdução: O estresse oxidativo e a inflamação são processos patológicos centrais no acidente vascular cerebral isquêmico (AVCi), aumentando o tamanho do infarto, comprometendo a recuperação local e piorando o prognóstico. Compreender esses mecanismos, de forma individual e interativa, é essencial para o desenvolvimento e avaliação de estratégias neuroprotetoras. **Objetivo:** Este estudo avaliou o efeito do soro de pacientes com AVC isquêmico na fase aguda, diluído em meio de cultura, sobre parâmetros de estresse oxidativo e inflamatórios em células astrogliais. **Métodos:** O soro humano foi obtido a partir de um estudo caso-controle aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (parecer nº 6.433.569). O estudo foi composto por fases clínica e pré-clínica. Nove pacientes (3 a 7 dias após o AVCi) e controles da comunidade pareados por idade e sexo foram recrutados e responderam a um questionário sociodemográfico e de saúde. Amostras de sangue foram coletadas para caracterização dos perfis lipídico e inflamatório do soro. Na fase pré-clínica, células astrogliais C6 receberam dois tratamentos: I) meio de cultura com 5% de um *pool* de soros de pacientes com AVC isquêmico agudo; e II) meio de cultura com 5% de um *pool* de soros de indivíduos controle. Após 24 horas, foram avaliadas a viabilidade celular, os parâmetros redox e as vias de sinalização inflamatória, utilizando o teste t de Student. **Resultados:** As idades médias foram de $59,33 \pm 18,70$ anos para os pacientes com AVC e $57,30 \pm 17,55$ anos para os controles. Pacientes com AVC apresentaram níveis significativamente mais elevados de glicemia e proteína C reativa (PCR) no soro ($p < 0,05$). Células astrogliais C6 expostas ao soro de pacientes com AVC isquêmico apresentaram níveis significativamente reduzidos de GSH, assim como atividades das enzimas CAT e SOD ($p < 0,001$). Além disso, a expressão de COX-2 e iNOS, bem como os níveis de IL-6, foram significativamente aumentados em relação ao grupo controle ($p < 0,001$). **Conclusão:** A exposição de células astrogliais C6 ao soro de pacientes com AVC isquêmico na fase aguda modulou o estresse oxidativo celular e aumentou a ativação de vias inflamatórias.

Palavras-chave: astrócito, acidente vascular cerebral, neuroinflamação, estresse oxidativo.

ABSTRACT

Introduction: Oxidative stress and inflammation are key pathological processes in ischemic stroke (IS), increasing infarct size, impairing local recovery, and worsening prognosis. Understanding these mechanisms, individually and interactively, is crucial for developing and evaluating neuroprotective strategies. **Objective:** This study evaluated the effect of serum from acute-phase ischemic stroke patients, diluted in culture medium, on oxidative stress and inflammatory parameters in astroglial cells. **Methods:** Human serum was obtained from a case-control study approved by the Research Ethics Committee (opinion 6,433,569). The study comprised clinical and preclinical phases. Nine patients (3-7 days post-IS) and age- and sex-matched community controls were recruited and completed a sociodemographic and health questionnaire. Blood samples were collected to characterize serum lipid and inflammatory profiles. In the preclinical phase, C6 astroglial cells received two treatments: I) culture medium with 5% pooled serum from acute stroke patients; and II) culture medium with 5% pooled serum from control patients. After 24 hours, cell viability, redox parameters, and inflammatory signaling pathways were performed using Student's t-test. **Results:** Mean ages were 59.33 ± 18.70 years for stroke patients and 57.30 ± 17.55 years for controls. Stroke patients showed significantly higher serum blood glucose and C-reactive protein (CRP) ($p < 0.05$). Astroglial C6 cells exposed to serum from ischemic stroke patients showed significantly reduced GSH levels, as well as CAT and SOD activities ($p < 0.001$). Moreover, COX-2 and iNOS expression, along with IL-6 levels, were significantly increased relative to the control group ($p < 0.001$). **Conclusion:** Exposure of astroglial C6 cells to acute-phase ischemic stroke patient serum modulated cellular oxidative stress and increased inflammatory pathway activation.

Keywords: Astroglial cells; Ischemic Stroke, Neuroinflammation, Oxidative stress.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figure 1. Overview of the study stages using a reverse translational research model. Schematic representation of the experimental workflow, highlighting the application of human-derived serum to astroglial cell cultures and subsequent analysis of cellular and molecular responses

47

Figure 2. Effects of 24-hour exposure to serum from ischemic stroke patients on C6 astroglial cells. (a) Representative images showing changes in C6 cell morphology following treatment. (b) Cell viability was assessed by MTT reduction after exposure to ischemic stroke patient serum ($p = 0.571$). (c) Glutamine synthetase (GS) enzymatic activity, expressed as $\mu\text{mol/mg protein/h}$ ($p = 0.954$). Data are presented as mean $\pm$ S.D. from at least nine independent experiments. Statistical comparisons between the two groups were performed using Student's t-test. Statistical significance was set at $p < 0.05$

48

Figure 3. Oxidative stress markers in C6 astroglial cells after 24-hour exposure to serum from ischemic stroke patients. a) Nrf2 mRNA expression ($p = 0.947$). b) GSH levels expressed as nmol/mg protein ($p = 0.017$). c) Catalase (CAT) activity expressed as Units/mg protein ($p = 0.044$). d) Superoxide dismutase (SOD) activity expressed as Units/mg protein ($p < 0.001$). Data represent mean $\pm$ S.D. from at least nine independent experiments. Statistical comparisons between the two groups were performed using Student's t-test. P-values < 0.05 were considered statistically significant

49

Figure 4. Expression of inflammatory markers in C6 astroglial cells after 24-hour exposure to serum from ischemic stroke patients. a) IL-1 β mRNA expression ($p = 0.839$) b) IL-6 mRNA expression ($p < 0.001$). c) TNF- α mRNA expression ($p = 0.586$). d) iNOS mRNA expression ($p = 0.029$). e) COX2 mRNA expression ($p < 0.001$). f) NF κ B mRNA expression ($p = 0.956$). Data are presented as mean $\pm$ S.D. from at least eight independent experiments. Statistical comparisons between the two groups were performed using Student's t-test. P-values < 0.05 were considered statistically significant

50

LISTA DE TABELAS

Projeto

Tabela 1 –Combinações de descritores utilizados para busca bibliográfica	05
Tabela 2 –Apresentação das variáveis analisadas no projeto	19

Artigo

Table 1. Descriptive analysis of sociodemographic and health characteristics of the study sample	44
Table 2. Comparative analysis of lipid profiles and inflammatory parameters between cases and controls	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABEP	Associação Brasileira das Empresas de Pesquisa
AIT	Ataque Isquêmico Transitório
AOS	Apneia Obstrutiva do sono
ASSIST	<i>Alcohol, Smoking and Substance Involvement Screening Test</i>
ATP	Adenosina Trifosfato
AVC	Acidente Vascular Cerebral
AVCh	Acidente Vascular Cerebral Hemorrágico
AVCi	Acidente Vascular Cerebral Isquêmico
BHE	Barreira hematoencefálica
BI	<i>Barthel index</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
DAMP	Padrão Molecular Associado a Dano
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
GFAP	Proteína Ácida Fibrilar Glial
HUSFP	Hospital Universitário São Francisco de Paula
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LCR	Líquido cefalorraquidiano
mRS	<i>modified Rankin Scale</i>
NIEPAS	Núcleo de Integração, Ensino, Pesquisa e Assistência
NIHSS	National Institute of Health Stroke Scale
NMDAR	N-methyl-D-aspartate receptor
NSE	Enolase Neurônio Específica
NT	Neurotransmissor
OMS	Organização Mundial de Saúde

RAGE	Receptor Transmembranar de Ligantes Múltiplos para Produtos Finais
SNC	Sistema Nervoso Central
SUS	Sistema Único de Saúde
S100B	Subunidade beta da Proteína Ligante de Cálcio S100
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
MTT	Methylthiazolyldiphenyltetrazolium bromide assay
GS	Glutamine synthetase
GSH	Glutathione
CAT	Catalase
SOD	Superoxide dismutase
TNF- α	Tumor necrosis factor alpha
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-6	Interleukin-6
iNOS	Inducible nitric oxide synthase
COX2	Cyclooxygenase 2
Nrf2	Nuclear factor erythroid 2
Nf κ β	Nuclear factor κ β
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
KCl	Potassium chloride
LDL	Low density lipoprotein

HDL	High density lipoprotein
CRP	C-reactive protein
MCAO	Middle cerebral artery occlusion
OGD	Oxygen and glucose deprivation
mRNA	Messenger ribonucleic acid

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	14
PARTE I: PROJETO DE PESQUISA QUALIFICADO	15
1. IDENTIFICAÇÃO	1
2. INTRODUÇÃO	2
3. OBJETIVOS	4
4. HIPÓTESES	4
5. REVISÃO DE LITERATURA	5
5.1 Estratégias de Busca	5
5.2 Acidente Vascular Cerebral (AVC)	5
5.2.1 Acidente Vascular Cerebral Isquêmico (AVCi)	6
5.2.2 Classificação quanto ao tempo	7
5.2.3 Fatores modificáveis e não modificáveis	8
5.2.4 Comprometimento neurológico	9
5.3 Biomarcadores de lesão neural	11
5.3.1 S100B	12
5.3.2 Enolase Neurônio Específica	13
5.3.3 GFAP	13
6. MÉTODO	14
6.1 Delineamento	14
6.2 Participantes	14
6.3 Procedimentos e instrumentos	16
6.3.1 Questionário de caracterização da amostra	17
6.3.2 Alcohol, Smoking and Substance Involvement Screening Test (ASSIST)	17
6.3.3 Critério de classificação econômica pela Associação Brasileira das Empresas de Pesquisa (ABEP)	18
6.3.4 National Institute of Health Stroke Scale (NIHSS)	18
6.3.5 Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay (ELISA)	19

6.4 Variáveis	19
6.5 Processamento e análise de dados	20
6.6 Aspectos éticos	21
6.7 Cronograma	22
6.8 Orçamento	23
REFERÊNCIAS	23
PARTE II: ARTIGO	28
1. INTRODUCTION	30
2. METHODS	31
3. RESULTS	34
4. DISCUSSION	36
REFERENCES	40
PARTE III: CONSIDERAÇÕES FINAIS	51
REFERÊNCIAS DA DISSERTAÇÃO	52
ANEXOS	56
ANEXO 1 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	56
ANEXO 2 - QUESTIONÁRIO DE FILTRAGEM DOS CONTROLES	59
ANEXO 3 - QUESTIONÁRIO DE CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	60
ANEXO 4- CLASSIFICAÇÃO SOCIOECONÔMICA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS EMPRESAS DE PESQUISA	62
ANEXO 5 - CLASSIFICAÇÃO DE DEPENDÊNCIA EM DROGAS (ASSIST)	65
ANEXO 6 - NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH STROKE SCALE (NIHSS)	67
ANEXO 7 - TERMO DE COMPROMISSO PARA UTILIZAÇÃO DE DADOS DE PRONTUÁRIOS MÉDICOS	73
ANEXO 8 - TERMO DE COMPROMISSO PARA UTILIZAÇÃO DE BANCO DE DADOS	74
ANEXO 9 - TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA REALIZAÇÃO DE PESQUISA	75
ANEXO 10 - TERMO DE COMPROMISSO PARA UTILIZAÇÃO DE DADOS	

COLETADOS	76
ANEXO 11 - PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	77

APRESENTAÇÃO

A presente dissertação apresentado como requisito parcial para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Saúde e Comportamento (PPGSC) encontra-se abaixo subdividido em três partes, sendo elas o projeto qualificado (parte I), o artigo (parte II) e considerações finais (parte III).

O projeto inicial foi qualificado intitulado Biomarcadores de lesão neural e sua relação com o comprometimento neurológico em pacientes pós Acidente Vascular Cerebral isquêmico (AVCi) agudo. No entanto, durante o período de coleta de dados foram encontradas dificuldades na obtenção do número amostral necessário para prosseguir com o tema. Por este motivo, para que se mantivesse o assunto central abordado inicialmente, através dos dados e amostras que já haviam sido obtidas neste projeto durante a fase de coleta, foi realizado um estudo *in vitro*, na forma de *reverse translational research*.

PARTE I: Projeto qualificado

Encontra-se subdividido em: introdução, objetivos e hipóteses, referencial teórico, método, cronograma, orçamento e referências. Nos anexos e apêndices encontram-se os instrumentos utilizados para a coleta dos dados, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, carta de autorização do local da realização da pesquisa e a carta de aceite do Comitê de Ética em Pesquisa. O trabalho, formatado nas normas de Vancouver e seguindo a estrutura orientada pelo modelo da Universidade Católica de Pelotas (UCPel), teve como objetivo avaliar a correlação entre biomarcadores séricos de lesão neural (S100B, NSE e GFAP) e o comprometimento neurológico em pacientes pós Acidente Vascular Cerebral isquêmico (AVCi) agudo.

PARTE II: Artigo

Encontra-se subdividido em: introdução, materiais e métodos, resultados, discussão e conclusão. Formatado nas normas de Vancouver e seguindo a estrutura orientada pelo modelo da UCPel teve como objetivo avaliar o efeitos da adição de 5% do soro de pacientes diagnosticados com AVCi na fase aguda ao meio de cultivo de uma linhagem celular C6 tipo-astrócitos em parâmetros inflamatórios e de estresse oxidativo.

PARTE III: Considerações finais

Aborda o objetivo do artigo e relaciona com os principais resultados, bem como evidencia o diferencial do trabalho e sua contribuição para a comunidade.

PARTE I: PROJETO DE PESQUISA QUALIFICADO

1. IDENTIFICAÇÃO

1.1 Título:

Biomarcadores de lesão neural e sua relação com o comprometimento neurológico em pacientes pós Acidente Vascular Cerebral isquêmico (AVCi) agudo.

1.2 Mestrando(a):

Isabela Thurow Lemes

1.3 Orientador:

Adriano Martimbianco de Assis

1.4 Instituição:

Universidade Católica de Pelotas

1.5 Curso:

Programa de Pós Graduação em Saúde e Comportamento

1.6 Linha de Pesquisa:

Neurociência

1.7 Data:

21/11/2023

2. INTRODUÇÃO

O Acidente Vascular Cerebral (AVC) é um evento neurológico onde ocorre interrupção do fluxo sanguíneo. Atinge aproximadamente 13,7 milhões de indivíduos e leva à morte 5,5 milhões anualmente, sendo a segunda maior causa de morte no mundo, além de ser um fator determinante para a instalação de incapacidades (1).

O AVC é caracterizado por uma alteração neurológica abrupta, motivada por disfunção na perfusão dos vasos sanguíneos que irrigam o cérebro. São classificados em dois grupos: o hemorrágico causado por escape ou sangramento dos vasos sanguíneos e o isquêmico quando ocorre uma oclusão em vasos sanguíneos, geralmente provocado por trombose ou embolia, diminuindo assim o fornecimento sanguíneo para o cérebro (2).

Acidente Vascular Cerebral Isquêmico (AVCi) é o mais frequente e tem a trombose intravascular como fator causador patológico principal, podendo levar a necrose do tecido cerebral e déficits neuronais focais, comprometendo regiões cerebrais. As consequências desses prejuízos podem causar déficits na funcionalidade do indivíduo, alterações cognitivas, entre outras (3). Essas alterações afetam a função cerebral por no mínimo 24 horas (4), e diferenciam-se de acordo com a área cerebral afetada. Portanto, podem atingir diferentes sistemas, como o sensorio-motor e ou cognitivo, determinando assim as sequelas e consequências, os pacientes comprometidos geralmente apresentam diminuição de sua independência na realização das atividades de vida diária (5) e maior parte dos indivíduos acometidos não apresentam recuperação funcional completa (4) sendo o déficit cognitivo uma sequela determinante para instalação de dependência funcional (5,6). Na fase aguda do evento isquêmico é onde ocorrem as maiores alterações neurológicas, portanto, é um momento crítico para a plasticidade neural, que carece de investigações e intervenções terapêuticas (7).

A interrupção do fluxo sanguíneo nos casos de AVCi gera um processo de excitotoxicidade, desencadeando assim uma sucessão de processos neuroquímicos que culminam com a morte por necrose das células neurais. Com a desintegração das membranas destas células neurais mortas, o seu conteúdo intracelular entra em contato com o líquido extracelular e neste momento, algumas proteínas exclusivas destes tipos celulares migram para a corrente sanguínea e podem ser detectadas no sangue. Estas moléculas podemos chamar de biomarcadores sanguíneos (8,9).

A literatura demonstra que alguns biomarcadores podem indicar disfunção endotelial, ativação de astrócitos, inflamação, fibrinólise, neuroplasticidade, anormalidade metabólica e estresse oxidativo (8). Essas substâncias, quando mensuradas, podem auxiliar a determinar o tamanho e a gravidade da lesão, contribuindo para definição do prognóstico, compreensão das respostas terapêuticas e implementação de medidas, na confirmação de diagnósticos e fidedignidade de testes alternativos (10). Dessa forma, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a relação entre biomarcadores de lesão neural e o comprometimento neurológico em pacientes diagnosticados com AVCi na fase aguda. Associar a medida destes biomarcadores ao comprometimento neurológico nos pacientes acometidos pode auxiliar na decisão de adoção de medidas neuroprotetoras e uma melhor visão prognóstica do quadro, além de servir como fator complementar na confiabilidade das escalas utilizadas.

3. OBJETIVOS

3.1. *Objetivo Geral*

Avaliar a correlação entre biomarcadores séricos de lesão neural (S100B, NSE e GFAP) e o comprometimento neurológico em pacientes pós AVCi agudo.

3.2 *Objetivos Específicos*

- a) Traçar o perfil sociodemográfico e características clínicas de pacientes na fase aguda do AVC;
- b) Verificar os níveis de biomarcadores séricos na fase aguda do AVCi em relação ao grupo controle;
- c) Verificar qual o biomarcador mais expresso na fase aguda do evento isquêmico.

4. HIPÓTESES

4.1 Hipótese do objetivo geral

Os níveis dos biomarcadores S100B, Enolase Neurônio Específica (NSE) e Proteína Ácida Fibrilar Glial (GFAP) são maiores em pacientes com maior comprometimento neurológico.

4.2 Hipóteses dos objetivos específicos

- a) A maior parcela será de pacientes do sexo feminino, hipertensas e tabagistas (11,12).
- b) Os níveis dos biomarcadores sanguíneos (S100B, GFAP e NSE) em pacientes com AVCi agudo estarão mais elevados em relação aos níveis do grupo controle.
- c) O biomarcador mais expresso na fase aguda do AVCi será a S100B (13).

5. REVISÃO DE LITERATURA

5.1 Estratégias de busca

A presente revisão de literatura foi realizada através dos artigos encontrados na base de dados *Pubmed* e *Scielo* através dos seguintes descritores: ischemic stroke, NSE (*neuron specific enolase*), GFAP (*Glial Fibrillary Acidic Protein*) e S100b (*S100 Calcium Binding Protein beta Subunit*) de acordo com as combinações referidas na Tabela 1, sem demais filtros. Os 40 artigos incluídos na revisão bibliográfica foram selecionados de acordo com a necessidade de abordagem na revisão, refinamentos na busca e, ainda, referências provenientes dos artigos selecionados dado a relevância do material original. Os artigos selecionados são compostos por artigos originais, artigos de revisão, editoriais, revisões sistemáticas e metanálises, sem restrição de tempo. Foram excluídos aqueles artigos que analisaram casos de AVC hemorrágico, que analisaram a relação dos biomarcadores apenas com exames de imagem ou intervenções medicamentosas e estudos cujo resultado, objetivo ou método não tenha sido relevante para a inclusão a partir da leitura de título e resumo.

Tabela 1. Combinações de descritores utilizados para busca bibliográfica

Descritores	<i>PubMed</i>	<i>Scielo</i>
((((ischemic stroke) AND (neuron specific enolase)) OR (Glial Fibrillary Acidic Protein)) AND (S100 Calcium Binding Protein beta Subunit)) / (AVC isquêmico) AND (NSE) OR (GFAP) OR (S100b)	235	115
((((ischemic stroke) AND (NSE)) AND (GFAP)) AND (S100b))	09	-
((((ischemic stroke) AND (NSE)) AND (S100b)) OR (GFAP)) AND (neurological impairment)	1.494	-
Total	1.756	

NSE: Enolase Neurônio Específica; S100B: Subunidade beta da Proteína Ligante de Cálcio S100; GFAP: Proteína Ácida Fibrilar Glial.

5.2 Acidente Vascular Cerebral (AVC)

O AVC é caracterizado pela parcial ou total obstrução do fluxo sanguíneo cerebral ou o extravasamento de sangue no tecido cerebral, é considerado uma disfunção neurológica aguda com origem vascular e de início súbito (4,14). Os sintomas do AVC

possuem uma duração de 24h ou mais, dentre as sequelas encontram-se a espasticidade anormal, padrões sinérgicos associados e incoordenação de membros superiores. Esses acometimentos geram dificuldades nas realizações das atividades de vida diária, como comer, tomar banho e se vestir, tornando o indivíduo dependente de outras pessoas para tais ações (4,15).

Esses sintomas, na grande parte dos indivíduos, manifestam-se como paresia ou plegias em um hemicorpo, acarretando déficits das funções motoras, sensoriais, de linguagens, perceptivas e comportamentais (16). O AVC é a segunda maior causa de morte a nível mundial e divide-se em dois principais tipos: isquêmico e hemorrágico (17). É a maior causa de morte no Brasil, também é a maior causa de incapacidade no mundo todo (18).

Na forma isquêmica, há a oclusão do fluxo sanguíneo e na forma hemorrágica ocorre o extravasamento de sangue. O primeiro apresenta maior incidência, responsável por 80% dos casos, enquanto o segundo apresenta maior causa de morte, com até 60% dos casos de AVC (5,19), ou seja, o hemorrágico possui maiores chances de mortalidade e morbidade (17). Pelos motivos supracitados, os pacientes acometidos pelo AVC_h não serão o público alvo do presente estudo, portanto, na sequência, serão abordados tópicos correspondentes ao AVC_i, que irá compor a amostragem desta pesquisa.

5.2.1 Acidente Vascular Cerebral Isquêmico (AVCi)

O AVC_i resulta da obstrução de uma artéria cerebral por um trombo (AVC Trombótico), compressão por tumor ou decorrente de oclusão arterial por um êmbolo (AVC Embólico) causando isquemia no local antes irrigado por tal artéria, seguido da morte do tecido acometido pela falta de suprimentos levados pelo sangue. Em alguns casos, quando a isquemia é solucionada antes que ocorra a morte do tecido adjacente, não levando a morte de neurônios e sintomas com duração inferior a 24 horas, o AVC é chamado de Ataque Isquêmico Transitório (AIT) (2).

Dentro da fisiopatologia do AVC_i, o grande problema encontrado é a hipóxia local que gera dano ao tecido cerebral, quando a redução da irrigação sanguínea ocorre, consequentemente, há queda na concentração de Adenosina Trifosfato (ATP) que é a fonte de abastecimento energético para que as comunicações interneuronais e demais funções ocorram com sucesso. Pela hipóxia gerada na isquemia há desequilíbrio iônico, gerando acidose láctica local e alterando o sistema de liberação e recaptção de

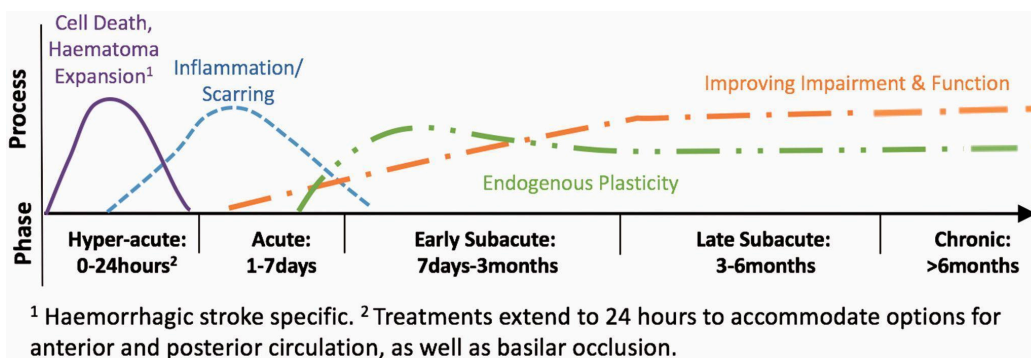
neurotransmissores e interferindo, principalmente, no metabolismo que envolve o glutamato (20).

O glutamato, potente neurotransmissor (NT) excitatório, tem seu metabolismo controlado por neurônios pré e pós sinápticos que são os responsáveis por estabelecer o tempo de permanência desse NT na fenda sináptica. Nos casos de AVCi a alteração nesse sistema de liberação e recaptação causa acúmulo de glutamato na fenda sináptica, gerando excitotoxicidade. O excesso de glutamato na fenda sináptica leva a superexcitação do receptor de glutamato N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) da membrana pós sináptica, além do aumento intracelular de cálcio que ativa suas enzimas dependentes, ocasionando morte celular (21).

5.2.2 Classificação quanto ao tempo

Para que se possa determinar um bom tratamento e proporcionar ao paciente um maior potencial de recuperação é necessário compreender que as taxas de recuperação do AVC são relacionadas ao tempo pós acometimento em que o paciente se encontra. Atualmente, o processo de reparação cerebral sugere que, durante as primeiras semanas ou meses, ocorrem a maioria das mudanças relacionadas ao processo de recuperação. Sendo assim, o conhecimento das fases do AVC e seus respectivos potenciais de reparação podem contribuir demasiadamente para um melhor prognóstico.

Quando se refere a biologia da recuperação foram amplamente utilizados, embora sem uma definição adequada, os termos: hiper-agudo, agudo, subagudo precoce, subagudo tardio e crônico. Literaturas atuais classificam a cronologia supracitada dentro dos primeiros seis meses pós AVC, sendo a fase hiperaguda correspondente às primeiras 24 horas, o período agudo limita-se aos primeiros sete dias de acometimento enquanto a etapa subaguda precoce e tardia encaixam-se, respectivamente, a partir da primeira semana à três meses e de três à seis meses após o AVC, sendo o período entre a fase aguda e subaguda precoce o mais crítico quando se trata de neuroplasticidade. Ao fim do primeiro semestre, inicia-se a fase crônica (7).



(Bernhardt J, Hayward KS, Kwakkel G, et al. 2017)

5.2.3 Fatores modificáveis e não modificáveis

Identificar os fatores de risco, principalmente os modificáveis, pode dar outro curso à história clínica da população suscetível. Hoje, os fatores de risco estabelecidos possuem intervenções para que se trabalhe a nível preventivo, ou então, minimize a gravidade dos quadros clínicos quando estes ocorrerem (1,22).

Nos fatores de risco não modificáveis encontram-se as variáveis sexo, raça e idade. Durante a idade jovem o AVC é mais frequente em mulheres do que em homens, situação que se inverte após esse período, onde o sexo masculino apresenta maior risco de acometimento, sendo a gravidade média considerada 10 para mulheres e 8,2 para homens (1,22). Tal risco na diferença entre sexos pode se dar por inúmeras particularidades. As mulheres possuem maior expectativa de vida de modo geral, assim, correndo maiores riscos de cursar com eventos de acometimento cardiovascular. Ainda, o sexo feminino apresenta maiores taxas relacionadas ao nível de estresse, ansiedade e depressão, a grande maioria faz uso de medicações anticoncepcionais que podem gerar alterações nos fatores de coagulação e níveis de pressão arterial, além de estarem expostas ao risco de hipertensão gestacional (23).

De acordo com a raça, o AVC apresenta-se mais frequentemente em negros do que brancos. Quando se trata da associação da etnia com o sexo, mulheres afro-americanas são, em média, duas vezes mais propensas a ter um AVC do que as mulheres caucasianas, fato que se interliga com a maior prevalência de fatores modificáveis como hipertensão, diabetes e obesidade nesse grupo. Os mexicanos-americanos possuem maiores taxas de acometimento vascular cerebral e morte encefálica em faixas etárias mais jovens do que quando comparados com brancos não hispânicos. Mesmo com os números de acometimentos por acidentes vasculares cerebrais tendo diminuído em todas as populações ao longo dos últimos anos, a

população hispânica tem taxas ascendentes desde 2013 (23,24).

Dentro dos fatores de risco modificáveis, os principais envolvem doenças como diabetes mellitus, hipertensão arterial sistêmica, hiperlipidemias e fatores associados a hábitos de vida como tabagismo, má alimentação ou estado nutricional, obesidade e inatividade física. Todos estes, epidemiologicamente, se associam majoritariamente a figura masculina, mas quando associados aos fatores de etnia e sexo, dão um pior prognóstico ao sexo feminino (23,24).

Nos últimos anos alguns fatores de risco adicionais também surgiram, mesmo que não tenham a exatidão da contribuição destas para o desenvolvimento do AVC. São estas: apneia obstrutiva do sono (AOS), que vem sendo associada ao aumento de hipertensão arterial sistêmica em indivíduos de todos os sexos e etnias, tendo como base estudos de coorte de 5 anos que demonstram que pessoas com AOS tiveram maiores riscos para AVC ou morte independente de outras doenças cerebrovasculares e, ainda, a expressão de lipoproteína A, ligada intimamente com casos de AVCi, principalmente em crianças (variando também de acordo com etnia e sexo), pela relação com desenvolvimento de ateroscleroses e trombogênese (24).

O gerenciamento destes fatores, além de reduzir o risco de acidentes vasculares cerebrais, também modificam diretamente o estilo de vida, independente das comorbidades subjacentes, contando também, como benefício e prevenção para outros acometimentos causados por outras patologias cardiovasculares e demência, principalmente em pacientes com início de AVC em idades mais jovens (22).

5.2.4 Comprometimento neurológico

Sabe-se que o AVC é a segunda principal causa de morte em todo o mundo, no entanto, mesmo que não leve à morte, o acometimento pode desencadear uma série de comprometimentos neurológicos graves e persistentes. Assim, o comprometimento neurológico do AVCi é uma pauta ampla relacionada a uma associação entre resultados funcionais e uma piora na qualidade de vida a longo prazo, apesar disso, sabe-se que essas implicações cognitivas são frequentemente subdiagnosticadas (9), podendo ocasionar um pior prognóstico. Dessa forma, o AVCi apresenta consequências persistentes além do déficit cinético funcional somente, como os déficits cognitivos e sensoriais. O tipo e a gravidade dos déficits neurológicos podem variar de acordo com a

localização, número, volume, extensão da lesão cerebral e do acometimento da isquemia (25). Analogamente a esse aspecto, os locais críticos mais importantes incluem os hemisférios dominantes e as lesões que afetam o circuito pré-frontal-subcortical de disfunção executiva, além do lobo frontal que compreende a velocidade de processamento, memória de trabalho e tarefas executivas, interferindo na qualidade de vida dos indivíduos acometidos (26,27).

Pacientes diagnosticados com AVC podem apresentar comprometimentos como: afasia, paresia de pelo menos um membro, paralisia facial, disartria, entre outros. A afasia, que além do AVC também pode ser proveniente da demência, é um distúrbio causado por danos a áreas do cérebro responsáveis por compreender e produzir a fala, a leitura e também a escrita. A área cerebral relacionada à elaboração da fala é denominada Área de Broca e a de compreensão da fala como Área de Wernicke. Sendo a Área de Broca neuroanatomicamente determinada como pars opercularis, localizada anteriormente ao sulco pré-frontal (área 44 de Brodmann), e pars triangular, entre os membros ascendentes e horizontais da fissura de Sylvia (área 45 de Brodmann). Em contrapartida, neuroanatomicamente a Área de Wernicke é designada como a parte circundante posterior do córtex auditivo na fissura de Sylvia (área 22 de Brodmann), onde os lobos temporal e parietal se unem. Paralelo a isso, lesões nessas regiões geram alterações relacionadas à fala (28).

O comprometimento cognitivo após o AVC é um achado frequente, mas negligenciado em comparação a outros déficits neurológicos, como comprometimento motor ou sensorial (29). O desempenho motor é relacionado à memória, função executiva e cognição global, o qual 20% a 50% dos pacientes sobreviventes a um AVC relatam dificuldades de memória. Frequentemente co-ocorrendo com déficits de linguagem, visuoespaciais e/ou executivos (30,31).

Outro problema desencadeado pelo mecanismo fisiopatológico do AVC são as disartrias, as quais irão ocorrer se as áreas capazes de compreender e produzir a fala após o AVC estiverem alteradas. Elas são um grupo de distúrbios motores da fala de origem neurológica que refletem anormalidades da respiração, fonação, articulação, ressonância e/ou prosódia que ocorrem devido a irregularidades de força, velocidade, amplitude, firmeza, tom ou precisão do mecanismo de fala. A disartria está associada a uma síndrome clássica de acidente vascular cerebral que leva a paresia facial e lingual central, síndrome da mão desajeitada, hemiparesia e/ou hemiparesia atáxica (28,30).

Os problemas cognitivos gerados a partir do AVCi são cruciais para a realização de atividades da vida diária e tendem a piorar progressivamente, com 20% a 30% dos pacientes desenvolvendo demência (6,13), além de outros processos mentais, como: atenção, memória de curto e longo prazo, raciocínio, coordenação de movimento e planejamento de tarefas. Por fim, as manifestações que contemplam o sistema sensorial envolvem diversos sintomas intimamente ligados, dentre eles a síndrome do ombro doloroso, dor crônica, dor neuropática e parestesia (32,33). Assim, sabemos que alguns biomarcadores podem auxiliar no prognóstico da doença e dimensionar o seu comprometimento.

Através disso, existem métodos que auxiliam as medidas nos ensaios de AVC, entre estes a *modified Rankin scale* (mRS), que é uma escala desenvolvida para medir o grau de incapacidade ou dependência nas atividades diárias de pessoas que sofrem o AVC ou outros distúrbios neurológicos (34), a escala *Barthel index* (BI) que é uma medida válida das atividades da vida cotidiana onde a sensibilidade à mudança é limitada em extremos de incapacidade (35), e a *National Institutes of Health Stroke Scale* (NIHSS), a qual é usada para medir a gravidade do AVC, por meio de quinze itens incluindo os domínios, nível de consciência, movimentos oculares, integridade dos campos visuais, movimentos faciais, força muscular de braços e pernas, sensação, coordenação, linguagem, fala e negligência, essa escala possui alto índice de confiabilidade, útil tanto para a prática clínica quanto para pesquisas, com administração rápida (menos de 10 minutos) necessita de poucos equipamentos, sendo uma ferramenta confiável, válida e de fácil acesso (36).

5.3 Biomarcadores de lesão neural

A partir do processo de excitotoxicidade gerado pela interrupção do fluxo sanguíneo nos casos de AVCi, uma série de processos neuroquímicos são desencadeados, o que, conseqüentemente, resultam em processos patológicos fazendo com que as células nervosas sejam danificadas ou mortas por estimulação excessiva de neurotransmissores (10). O *National Institutes of Health Biomarkers Definitions Working Group* definiu, em 2001, que os biomarcadores são “uma característica que é objetivamente medida e avaliada como um indicador de processos biológicos normais, processos patogênicos ou respostas farmacológicas a uma intervenção terapêutica”. Essas substâncias, após mensuradas, podem auxiliar para compreender prognósticos, avaliar respostas terapêuticas, prever medidas a serem adotadas, auxílio na

caracterização do tamanho e gravidade de casos clínicos, auxiliar na confirmação de diagnósticos e confirmar a fidedignidade de testes alternativos.

A quantificação dessas proteínas no sangue pode auxiliar no diagnóstico, indicar ativação glial, lesão neuronal, estresse oxidativo, liberação de mediadores inflamatórios, entre outros, que são liberados após um evento patológico(10).

Os seguintes biomarcadores propostos a avaliação neste projeto relacionam-se ao AVCi relacionando-se a gravidade do caso e áreas afetadas incluindo a excitotoxicidade, fatores neuro inflamatórios, disfunções, apoptose neuronal, estresse oxidativo, ativação astrocitária, entre outros.

5.3.1 S100B

A S100B, subunidade beta da proteína ligante de cálcio S100, é encontrada no Sistema Nervoso Central (SNC), principalmente nos astrócitos e células de *Schwann* (8), e no meio extracelular comunica-se essencialmente, mas não unicamente, mediado pelo Receptor Transmembranar de Ligantes Múltiplos para Produtos Finais de Glicação Avançada (RAGE), dando início a uma série de sinalizações intracelulares capazes de culminar em regulação fisiológica, em menores concentrações nanomolares, ou em processos patogênicos, quando em elevadas concentrações micromolares, atuando como proteína de Padrão Molecular Associado a Dano (DAMP) (37). É um biomarcador que as células gliais liberam posteriormente ao rompimento da barreira hematoencefálica (BHE) decorrente de processos de excitotoxicidade acarretados pela isquemia, a S100B inicialmente atinge o líquido cefalorraquidiano (LCR) e depois a corrente sanguínea (8), é também utilizado como sinalizador de sofrimento neural ativo (37).

Apesar de não se ter especificado quantias preditivas de níveis séricos de S100B, foi constatado que há pico deste biomarcador após 48h do AVCi hiperagudo. A proteína S100B pôde ser correlacionada estreitamente ao risco do AVCi tornar-se hemorrágico, ao déficit de função cinético funcional (8) e auxiliar no diagnóstico (10). A presença de S100B no sangue apresenta um pico dos níveis séricos 3 dias após o início dos sintomas de AVCi e sua concentração elevada demonstrou ser preditiva para a sobrevivência de pacientes a médio prazo. A concentração de S100B está intimamente associada com o risco de transformação hemorrágica pós trombólise e infarto agudo do miocárdio (8).

5.3.2 Enolase Neurônio Específica

A enolase neurônio específica (NSE) é uma enzima intracelular em neurônios e células neuroendócrinas que é liberada no meio extracelular quando as células nervosas são afetadas, tornando possível, através da sua mensuração, avaliar a extensão do comprometimento estrutural e a sinalização de danos das biomembranas no SNC (8). Deste modo, a literatura aponta uma correlação positiva entre o nível de NSE no plasma sanguíneo com o volume do foco isquêmico e a gravidade dos sintomas neurológicos. Como preditor de bom resultado funcional no período agudo da doença, níveis reduzidos de NSE em relação aos controles, já a alta probabilidade de resultado letal está associada a níveis elevados (38). Ainda, após a estimulação, as superfícies celulares podem sofrer dano pela NSE pois a mesma atua como receptor plasminogênio levando a degradação da matriz extracelular e induzindo danos teciduais, acúmulo de células inflamatórias em locais afetados e produção de quimiocinas e citocinas (8). Dessa forma, nos casos de AVCi há uma interrupção do fluxo sanguíneo, gerando uma excitotoxicidade que desencadeia uma série de processos inflamatórios, acumulando substâncias bioativas e/ou populações celulares, sendo denominadas biomarcadores. Tratando-se da NSE, a mesma é encontrada em lesões neuronais, especificamente.

A NSE tem um papel importante no metabolismo energético, por modular a glicólise, estando envolvida na diferenciação neuronal, neuroplasticidade e na sobrevivência celular. Anormalidades nos níveis de NSE estão relacionados a anormalidades bioenergéticas, fornecendo diversas evidências de comprometimento energético e disfunção mitocondrial metabólica grave, prejudicando o desenvolvimento neuronal e a neuroproteção.

5.3.3 GFAP

A Proteína Ácida Fibrilar Glial (GFAP), é composta por um filamento intermediário e monomérico do esqueleto astrogial. É uma proteína considerada específica do cérebro, expressa por astrócitos em sua maioria (8,39) e sua presença em níveis elevados propõe o desfecho de um papel crítico, onde sua acentuação é positiva em lesões do SNC, indicando danos astrocitários por lesão neurológica (39). A GFAP é encontrada nas matérias brancas e cinzentas do SNC e liberada rapidamente dos tecidos cerebrais danificados (8,39,40). Suas concentrações séricas foram relatadas de

forma numerosa ao serem analisadas 8 horas após o início do acidente vascular cerebral, e permanecem, em sua maioria, notáveis por pelo menos 5 dias (8,39). Além disso, a GFAP e a cinética da liberação estão conectadas ao desenvolvimento e progressividade dos déficits neurológicos e, portanto, pode ser eventualmente utilizada de forma a apresentar-se como indicador adicional dos resultados prematuros bem como do prognóstico. Pelo fato dos seus níveis séricos serem comumente reduzidos quando comparados a indivíduos saudáveis, seja pela diminuição do fluxo sanguíneo ou redução do suprimento de oxigênio, o dano estrutural ao cérebro causa um extravasamento desta proteína do tecido cerebral para o LCR, autonomamente da circunstância funcional do rompimento da BHE. No entanto, demais mecanismos têm de ser esclarecidos para o aumento dos níveis séricos, compreendendo o fato da GFAP ser um filamento intermediário do citoesqueleto, desempenhando um papel de suma importância na astrogliose reativa do SNC, tendo em vista as mudanças diretamente ligadas aos astrócitos, em resposta a lesões aos tecidos nervosos e a citosina, anomalias metabólicas e as condições de neurodegeneração (8).

6. MÉTODO

6.1 Delineamento

Trata-se de um estudo de caso-controle.

6.2 Participantes

Pacientes de ambos os sexos, maiores de 18 anos internados na enfermaria SUS do Hospital Universitário São Francisco de Paula (HUSFP) com diagnóstico de Acidente Vascular Cerebral Isquêmico (AVCi) agudo, entre o terceiro e sétimo dia após o diagnóstico. Farão parte do estudo todos os pacientes internados no Hospital Universitário São Francisco de Paula (HUSFP) no período da coleta de dados, que se encaixarem nos critérios de inclusão, até a finalização do tamanho amostral. Os pacientes do grupo controle serão captados após traçado o perfil (idade e sexo) dos pacientes com AVCi, para pareamento da amostra e captados na comunidade.

Neste estudo serão incluídos 102 indivíduos ao todo.

O cálculo amostral do grupo com diagnóstico de AVCi foi realizado através do coeficiente correlação obtido na literatura pelo estudo de Grymajlo, et al (2018)(41) que obteve um valor de correlação entre $r=0,35$ e $r=0,39$ na associação do biomarcador NSE e a pontuação na NIHSS. Devido à falta de trabalhos na literatura correlacionando os níveis séricos de GFAP e S100B com o comprometimento neurológico em pacientes com AVCi utilizando o mesmo instrumento, não foi possível realizar o cálculo amostral para estes biomarcadores. Deste modo, através do valor de correlação obtido pelo biomarcador NSE, encontra-se uma população necessária de 62 pessoas, com acréscimo de 10%, totalizando 68 indivíduos acometidos por AVCi agudo. Para o grupo controle, será pareado por sexo e idade na comunidade um controle a cada dois casos, resultando em 34 pessoas.

6.2.1 Critérios de inclusão

No grupo AVCi serão incluídos pacientes de ambos os sexos, maiores de 18 anos e com diagnóstico de AVC isquêmico agudo internados na enfermaria do Hospital Universitário São Francisco de Paula (HUSFP) pelo Sistema Único de Saúde (SUS) do terceiro ao sétimo dia pós diagnóstico. Quanto ao grupo controle, serão incluídos aqueles que irão encaixar-se de acordo com o perfil definido (sexo e idade) após a coleta de dados dos casos, uma vez que nunca tenham sido diagnosticados com nenhum tipo de AVC. Para ambos os grupos, a aceitação da coleta sanguínea também é um critério de inclusão.

6.2.2 Critérios de exclusão

Serão excluídos aqueles pacientes que possuam diagnóstico de AVC prévio com sequelas já instaladas ou doenças com comprometimento motor prévio, pacientes com dificuldade de compreensão do instrumento, analfabetos, pacientes com doenças neuro inflamatórias e/ou neurodegenerativas ou lesão cerebral traumática recente. A presença de lesão cerebral traumática recente, doenças neuro inflamatórias e/ou neurodegenerativas também aplica-se como critério de exclusão aos controles.

6.3 Procedimentos e instrumentos

Após a aprovação do Núcleo de Integração, Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital Universitário São Francisco de Paula (NIEPAS/HUSFP) e aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Católica de Pelotas, as chefias do serviço de fisioterapia e médica do HUSFP serão informadas sobre a execução do projeto e a coleta dos dados será iniciada.

A captação dos participantes do estudo se dará no período de 8 meses, de outubro de 2023 a maio de 2024. A captação dos casos se dará por conferência nos prontuários das enfermarias a cada dois dias ou conforme demanda, durante o período supracitado e nas unidades que atendem pacientes do SUS: Clínica Médica, Nossa Senhora de Guadalupe e Clínica Cirúrgica.

Quando identificado o diagnóstico clínico de AVC isquêmico agudo será, inicialmente, feita uma triagem dos dados disponibilizados no prontuário a fim de conferir se o potencial participante possui algum critério referente à exclusão.

Após a triagem inicial, o paciente será visitado para a confirmação dos demais critérios de inclusão que, eventualmente, não forem atingidos através da leitura do prontuário. Ao atender os critérios, será esclarecido ao paciente ou responsável o funcionamento do estudo bem como sua relevância e ficará explícito que a recusa em participar não gerará qualquer mudança na conduta do serviço prestado. Se o paciente ou responsável concordar em participar do estudo, receberá o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice 1) e, somente após assinado, se iniciará a avaliação com a aplicação dos instrumentos posteriormente descritos. A coleta de dados será realizada por bolsistas de iniciação científica previamente treinados. O primeiro instrumento aplicado será o questionário de caracterização da amostra (Apêndice 2), seguido pela aplicação da escala de classificação socioeconômica brasileira estabelecida pela ABEP (Anexo 1), além do questionário ASSIST (Anexo 2) para detecção de uso abusivo/dependência do envolvimento com álcool, tabaco e outras substâncias e a *National Institute of Health Stroke Scale* (NIHSS) (Anexo 3). Por fim, será realizada a coleta de uma amostra sanguínea de aproximadamente 15 mL em tubo de vácuo livre de anticoagulante (realizada por enfermeiras colaboradoras do projeto) que seguirá para centrifugação a 3500 rpm por 15 minutos para extração do soro, que será armazenamento em freezer -80 graus dentro de um período máximo de quatro horas e mantido congelado até o momento da análise da presença de biomarcadores de lesão

neural (S100B, NSE e GFAP) através do método ELISA. Os pacientes do grupo controle serão captados após traçado o perfil (idade e sexo) dos pacientes com AVCi, para pareamento da amostra. Esses, serão captados na comunidade e avaliados através de um questionário para filtragem dos critérios de inclusão e exclusão (Apêndice 3), posteriormente a um questionário de caracterização da amostra, aos critérios de classificação socioeconômica brasileira estabelecidos pela ABEP e a escala ASSIST. Do mesmo modo, esses pacientes serão submetidos a venopunção para coleta de uma amostra de sangue de aproximadamente 15mL (que será processado e armazenado da mesma maneira supracitada) para que a dosagem dos biomarcadores em pacientes sem o diagnóstico de AVCi seja utilizado como valor de referência.

6.3.1 *Questionário de caracterização da amostra*

Elaborado no formato on-line através da plataforma *Google Forms*, que subdivide-se em quatro categorias contendo: dados de identificação, questionamentos acerca de dados pessoais e perfil sociodemográfico e de saúde. O instrumento possui questões com respostas de múltipla escolha e subjetivas, que serão aplicadas e preenchidas pelo entrevistador, incluindo informações contidas no prontuário e coletadas com os participantes e/ou familiar ou responsável (Apêndice 3).

6.3.2 *Alcohol, Smoking and Substance Involvement Screening Test (ASSIST)*

Refere-se a um instrumento criado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) utilizado para a detecção precoce do uso de nove tipos de substâncias, sendo elas: derivados do tabaco, bebidas alcoólicas, maconha, cocaína/crack, anfetaminas ou êxtase, inalantes, hipnóticos/sedativos, alucinógenos e opióides.

Trata-se de um teste de alta relevância, visto que, uma das maiores dificuldades no que diz respeito aos pacientes em relação ao uso de álcool e drogas consiste na determinação dos limites, a partir dos quais, o uso pode ser considerado abusivo. Consiste em um questionário estruturado e composto por oito perguntas, cada resposta corresponde a um escore que varia de 0 a 4, sendo a soma total de 0 a 20. A faixa de escore de 0 a 3 é considerada como indicativa de uso ocasional, de 4 a 15 como indicativa de abuso e acima de 16 como sugestiva de dependência. Nesta perspectiva, a ASSIST mostra-se extremamente útil, uma vez que, seu resultado permite classificar o

padrão de uso dessas substâncias, facilitando os procedimentos de intervenção ou encaminhamento (41).

6.3.3 Critério de classificação econômica pela Associação Brasileira das Empresas de Pesquisa (ABEP)

Os fatores socioeconômicos da população brasileira podem ser analisados, dentre outras maneiras, através do status das famílias, pois as necessidades de cada núcleo familiar costuma ser de maior ou menor grau conforme seu status.

Todavia, a ABEP é responsável por essa análise, incluindo em seus critérios avaliativos dados como, características físicas do domicílio e acesso a utilidades públicas, composição familiar, educação, emprego e rendimentos de cada membro da família, aspectos das condições de vida da família, diferenças regionais e de localização, quantidade possuída de bens duráveis e montante consumido de bens e serviços. Essas informações são de grande utilidade para entender o comportamento de como os domicílios alocam o orçamento familiar, e determinar, a classe socioeconômica em que se classifica (baixa, média ou alta). Visto que, em uma sociedade dinâmica como a brasileira, é esperado que a estratificação socioeconômica mude num período relativamente curto e, portanto, a definição destes estratos deve acompanhar essa dinâmica. Por outro lado, esse tipo de segmentação da população de domicílios deve ser feito com base em dados verídicos de uma amostra representativa do total da população do País, como são os dados da pesquisa de orçamentos familiares coletados pelo IBGE (42).

6.3.4 National Institute of Health Stroke Scale (NIHSS)

Trata-se de uma escala que avalia o comprometimento neurológico através de 11 itens utilizados para medir a gravidade do AVC, preferencialmente na fase aguda. Para aplicabilidade, há um treinamento disponibilizado de forma online e gratuita pelo *National Institute of Health* através da plataforma *BlueCloud* que certifica todos os aplicadores que o realizaram. Todos os colaboradores envolvidos na coleta de dados realizarão o treinamento até o início da coleta de dados. O NIHSS inclui a avaliação de diferentes domínios que observam características de diferentes regiões, através de aspectos como: movimentos oculares, integridade dos campos visuais; fala, linguagem e nível de consciência (no âmbito cognitivo); força muscular de braços e pernas, coordenação e negligência (no âmbito cinético funcional). A pontuação de cada aspecto

avaliado é feita em uma escala ordinal que oscila de 0 a 2, 0 a 3 ou 0 a 4. A soma das pontuações totais varia de 0 a 42 e quanto maior a pontuação, maior a gravidade do AVC e do comprometimento neurológico. O NIHSS apresenta uma confiabilidade avaliada entre moderada a alta interavaliador ($\kappa = 0,69$) e segundo a literatura, se mostra um forte preditor de resultados após AVC (36).

6.3.5 *Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay (ELISA)*

A partir de uma amostra sanguínea coletada através de uma punção venosa realizada por profissional capacitado (enfermeira), serão dosadas as proteínas S100B, NSE e GFAP pelo nível sérico. Tal dado será analisado pela técnica de ELISA (do inglês "*Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay*"), que resulta da interação antígeno-anticorpo através de reações enzimáticas, tendo como enzima mais utilizada, a peroxidase. Na forma do teste mais utilizada, chamada ELISA indireto, o soro do paciente com suspeita da presença do antígeno é adicionado a uma placa de ELISA. Na presença de anticorpos no soro em teste ocorre a formação da ligação antígeno-anticorpo, detectada, na sequência, pela adição de um segundo anticorpo, onde se liga a peroxidase (43).

6.4 Variáveis

Tabela 2. Apresentação das variáveis analisadas no projeto

<i>Variável</i>	<i>Tipo de variável</i>
Sexo	Categórica dicotômica
Idade	Numérica discreta
Profissão/ocupação	Categórica politômica nominal
Nível de instrução	Categórica politômica ordinal
Data do diagnóstico	Numérica discreta
Raça	Categórica politômica nominal
Estado civil	Categórica politômica nominal
Renda	Numérica contínua
Comorbidades associadas	Categórica politômica nominal
Tabagismo	Categórica politômica ordinal

Alcoolismo	Categórica politômica nominal
Hipertensão	Categórica dicotômica
Comprometimento neurológico	Categórica politômica ordinal
Nível sérico de ENE	Numérica contínua
Nível sérico de S100B	Numérica contínua
Nível sérico de PAFG	Numérica contínua

NSE: Enolase Neurônio Específica; S100B: Subunidade beta da Proteína Ligante de Cálcio S100; GFAP: Proteína Ácida Fibrilar Glial.

6.5 Processamento e análise de dados

Os dados contidos no questionário serão coletados do prontuário e diretamente com o paciente e/ou responsável e registrados pelos(as) colaboradores(as) na plataforma *Google Forms*. Os dados coletados através da aplicação da escala NIHSS serão documentados de forma física e impressa para cada paciente. Estes, serão duplamente transferidos para a planilha eletrônica *Google Planilhas* e os dados coletados através do questionário ficarão salvos no processamento automático da plataforma *Google Forms*, que os converte automaticamente em planilha eletrônica/gráficos e processados no mesmo. A análise dos dados coletados será realizada por meio de descrição das características sociodemográficas e de saúde através do programa *IBM Statistical Package for Social Sciences (SPSS) versão 24.0*, a quantificação das proteínas biomarcadores de lesão neural será realizada pelo teste de ELISA e a variável expressa de forma numérica através de espectrofotometria. Ainda, a pontuação obtida na NIHSS será transcrita para a planilha eletrônica *Google Planilhas*. Serão avaliados e associados os resultados da avaliação de cada participante com as demais variáveis do estudo. A análise descritiva das variáveis categóricas será realizada por meio de frequências absolutas e relativas. Para as variáveis numéricas, as medidas de posição e dispersão serão apresentadas de acordo com a distribuição dos dados em relação à curva normal. Quando a distribuição for normal, os dados serão expressos como média e desvio padrão, sendo analisados pelos testes t de Student, análise de variância (ANOVA) e correlação de Pearson. Caso a distribuição não seja normal, os dados serão apresentados

como mediana e intervalos interquartis, com a aplicação dos testes não paramétricos correspondentes: Mann-Whitney, Kruskal-Wallis e correlação de Spearman.

6.6 Aspectos éticos

O presente projeto será submetido à revisão da banca examinadora e enviado ao NIEPAS/HUSFP, após aprovação, será encaminhado ao da Universidade Católica de Pelotas através da submissão pela Plataforma Brasil, juntamente com a documentação necessária. O início da coleta de dados se dará somente após aprovação do CEP. Todos os participantes receberão informações sobre os objetivos e funcionamento da pesquisa e assinarão o TCLE formulado de acordo com as normas exigidas pelos órgãos supracitados e todos os dados coletados serão mantidos em total sigilo. A pesquisa não causará interferência na saúde ou bem estar do paciente, ainda, a recusa em participar do estudo não gerará qualquer mudança na conduta do serviço prestado pelas instituições envolvidas. Mesmo após concordar com a participação no estudo, o participante poderá solicitar desligamento da pesquisa a qualquer momento.

6.6.1 Riscos

Os riscos são mínimos para quaisquer envolvidos no processo de coleta de dados e no processo de avaliação, entrevista e participação, podendo apenas gerar leve desconforto ao responder questões de cunho pessoal que serão minimizados pelo anonimato dos dados, possível hematoma decorrente da coleta sanguínea ou pela realização de algum movimento solicitado durante a aplicação do instrumento de avaliação do comprometimento neurológico pós AVC.

6.6.2 Benefícios

Aumento dos conhecimentos técnico-científicos acerca do tema e melhores perspectivas sobre o prognóstico destes pacientes relacionando o diagnóstico clínico, cinético funcional, sensorial cognitivo e sociodemográfico dos pacientes acometidos por AVCi através dos dados coletados e analisados no presente estudo.

6.8 Orçamento

Item	Quantidade	Valor unitário	Valor total
Kit Human S100B - ELISA	1	R\$3.500,00	R\$3.500,00
Kit Proteína Ácida Fibrilar Glial (GFAP) Humano - ELISA	1	R\$3.500,00	R\$3.500,00
Kit Human Neuropeptide Y (NPY) - ELISA	1	R\$3.500,00	R\$3.500,00
Materiais plásticos	200	R\$1,20	R\$240,00
Materiais impressos	1000	R\$0,15	R\$150,00
Total			R\$10.890,00

Fonte viabilizadora: Edital Universal CNPQ 2021.

REFERÊNCIAS

1. Kuriakose D, Xiao Z. Pathophysiology and Treatment of Stroke: Present Status and Future Perspectives. Int J Mol Sci. 15 de outubro de 2020;21(20):7609.
2. Iadecola C, Buckwalter MS, Anrather J. Immune responses to stroke: mechanisms, modulation, and therapeutic potential. J Clin Invest. 1º de junho de 2020;130(6):2777–88.
3. Zhao Y, Zhang X, Chen X, Wei Y. Neuronal injuries in cerebral infarction and ischemic stroke: From mechanisms to treatment (Review). Int J Mol Med. fevereiro de 2022;49(2):15.
4. Eraifej J, Clark W, France B, Desando S, Moore D. Effectiveness of upper limb functional electrical stimulation after stroke for the improvement of activities of

- daily living and motor function: a systematic review and meta-analysis. *Syst Rev*. 28 de fevereiro de 2017;6(1):40.
5. Appelros P, Nydevik I, Viitanen M. Poor outcome after first-ever stroke: predictors for death, dependency, and recurrent stroke within the first year. *Stroke*. janeiro de 2003;34(1):122–6.
 6. Rost NS, Brodtmann A, Pase MP, van Veluw SJ, Biffi A, Duering M, et al. Post-Stroke Cognitive Impairment and Dementia. *Circ Res*. 15 de abril de 2022;130(8):1252–71.
 7. 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 [Internet]. 2017 [citado 23 de outubro de 2023]. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/1747493017711816>
 8. Huang Y, Wang Z, Huang ZX, Liu Z. Biomarkers and the outcomes of ischemic stroke - PMC [Internet]. 2023 [citado 23 de outubro de 2023]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10277488/>
 9. Kim KY, Shin KY, Chang KA. Potential Biomarkers for Post-Stroke Cognitive Impairment: A Systematic Review and Meta-Analysis - PMC [Internet]. 2022 [citado 23 de outubro de 2023]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8775398/>
 10. Wijerathne H, Witek MA, Baird AE, Soper SA. Liquid biopsy markers for stroke diagnosis. *Expert Rev Mol Diagn*. agosto de 2020;20(8):771–88.
 11. Jacob MA, Ekker MS, Allach Y, Cai M, Aarnio K, Arauz A, et al. Global Differences in Risk Factors, Etiology, and Outcome of Ischemic Stroke in Young Adults-A Worldwide Meta-analysis: The GOAL Initiative. *Neurology*. 8 de fevereiro de 2022;98(6):e573–88.
 12. Virani SS, Alonso A, Aparicio HJ, Benjamin EJ, Bittencourt MS, Callaway CW, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2021 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 23 de fevereiro de 2021;143(8):e254–743.
 13. Salthouse TA. Trajectories of normal cognitive aging. *Psychol Aging*. fevereiro de 2019;34(1):17–24.
 14. Ayehu GW, Yitbarek GY, Zewdie EA, Amsalu BT, Abie Y, Atlaw D, et al. Risk profile, clinical presentation, and determinants of stroke subtypes among patients with stroke admitted to public referral hospitals, Northwest Ethiopia in 2021: A

- cross-sectional study. *Front Neurol.* 2022;13:988677.
15. Pollock A, Farmer SE, Brady MC, Langhorne P, Mead GE, Mehrholz J, et al. Interventions for improving upper limb function after stroke. *Cochrane Database Syst Rev.* 12 de novembro de 2014;2014(11):CD010820.
 16. Datta S, Karmakar CK, Yan B, Palaniswami M. Novel Measures of Similarity and Asymmetry in Upper Limb Activities for Identifying Hemiparetic Severity in Stroke Survivors. *IEEE J Biomed Health Inform.* junho de 2021;25(6):1964–74.
 17. Luo Y, Reis C, Chen S. NLRP3 Inflammasome in the Pathophysiology of Hemorrhagic Stroke: A Review. *Curr Neuropharmacol.* 2019;17(7):582–9.
 18. Campbell BCV, De Silva DA, Macleod MR, Coutts SB, Schwamm LH, Davis SM, et al. Ischaemic stroke. *Nat Rev Dis Primer.* 10 de outubro de 2019;5(1):70.
 19. Doria JW, Forgacs PB. Incidence, Implications, and Management of Seizures Following Ischemic and Hemorrhagic Stroke. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 27 de maio de 2019;19(7):37.
 20. Barthels D, Das H. Current Advances in Ischemic Stroke Research and Therapies. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 1º de abril de 2020;1866(4):165260.
 21. Shen Z, Xiang M, Chen C, Ding F, Wang Y, Shang C, et al. Glutamate excitotoxicity: Potential therapeutic target for ischemic stroke. *Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother.* julho de 2022;151:113125.
 22. Johansson A, Drake I, Engström G, Acosta S. Modifiable and Non-Modifiable Risk Factors for Atherothrombotic Ischemic Stroke among Subjects in the Malmö Diet and Cancer Study. *Nutrients.* 6 de junho de 2021;13(6):1952.
 23. Roy-O'Reilly M, McCullough LD. Age and Sex Are Critical Factors in Ischemic Stroke Pathology. *Endocrinology.* 1º de agosto de 2018;159(8):3120–31.
 24. Guzik A, Bushnell C. Stroke Epidemiology and Risk Factor Management. *Contin Minneap Minn.* fevereiro de 2017;23(1, Cerebrovascular Disease):15–39.
 25. van der Ende NAM, den Hartog SJ, Broderick JP, Khatri P, Visser-Meily JMA, van Leeuwen N, et al. Disentangling the Association Between Neurologic Deficits, Patient-Reported Impairments, and Quality of Life After Ischemic Stroke. *Neurology.* 28 de março de 2023;100(13):e1321–8.
 26. Hachinski V, Iadecola C, Petersen RC, Breteler MM, Nyenhuis DL, Black SE, et al. National Institute of Neurological Disorders and Stroke-Canadian Stroke Network vascular cognitive impairment harmonization standards. *Stroke.* setembro de 2006;37(9):2220–41.

27. Pendlebury ST, Rothwell PM. Prevalence, incidence, and factors associated with pre-stroke and post-stroke dementia: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol.* novembro de 2009;8(11):1006–18.
28. Price C, Seghier M, Leff A. Predicting Language Outcome and Recovery After Stroke (PLORAS). *Nat Rev Neurol.* abril de 2010;6(4):202–10.
29. Jacova C, Pearce LA, Costello R, McClure LA, Holliday SL, Hart RG, et al. Cognitive impairment in lacunar strokes: the SPS3 trial. *Ann Neurol.* setembro de 2012;72(3):351–62.
30. Lim C, Alexander MP. Stroke and episodic memory disorders. *Neuropsychologia.* dezembro de 2009;47(14):3045–58.
31. Einstad MS, Saltvedt I, Lydersen S, Ursin MH, Munthe-Kaas R, Ihle-Hansen H, et al. Associations between post-stroke motor and cognitive function: a cross-sectional study. *BMC Geriatr.* 5 de fevereiro de 2021;21(1):103.
32. Tao J, Xie X, Luo M, Sun Q. Identification of key biomarkers in ischemic stroke: single-cell sequencing and weighted co-expression network analysis. *Aging.* 6 de julho de 2023;15(13):6346–60.
33. Verhaeghen P, Salthouse TA. Meta-analyses of age-cognition relations in adulthood: estimates of linear and nonlinear age effects and structural models. *Psychol Bull.* novembro de 1997;122(3):231–49.
34. Haggag H, Hodgson C. Clinimetrics: Modified Rankin Scale (mRS). *J Physiother.* outubro de 2022;68(4):281.
35. Quinn TJ, Langhorne P, Stott DJ. Barthel index for stroke trials: development, properties, and application. *Stroke.* abril de 2011;42(4):1146–51.
36. Kwah LK, Diong J. National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS). *J Physiother.* março de 2014;60(1):61.
37. Michetti F, Clementi ME, Di Liddo R, Valeriani F, Ria F, Rende M, et al. The S100B Protein: A Multifaceted Pathogenic Factor More Than a Biomarker. *Int J Mol Sci.* 31 de maio de 2023;24(11):9605.
38. Butterworth RJ, Wassif WS, Sherwood RA, Gerges A, Poyser KH, Garthwaite J, et al. Serum neuron-specific enolase, carnosinase, and their ratio in acute stroke. An enzymatic test for predicting outcome? *Stroke.* novembro de 1996;27(11):2064–8.
39. Amalia L. Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP): Neuroinflammation Biomarker in Acute Ischemic Stroke. *J Inflamm Res.* 2021;14:7501–6.
40. Ferrari F, Rossi D, Ricciardi A, Morasso C, Brambilla L, Albasini S, et al.

- Quantification and prospective evaluation of serum NfL and GFAP as blood-derived biomarkers of outcome in acute ischemic stroke patients. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab.* setembro de 2023;43(9):1601–11.
41. WHO ASSIST Working Group. The Alcohol, Smoking and Substance Involvement Screening Test (ASSIST): development, reliability and feasibility. *Addict Abingdon Engl.* setembro de 2002;97(9):1183–94.
42. Kamakura W, Mazzon JA. CRITÉRIOS DE ESTRATIFICAÇÃO E COMPARAÇÃO DE CLASSIFICADORES SOCIOECONÔMICOS NO BRASIL. *Rev Adm Empres.* fevereiro de 2016;56:55–70.
43. Tabatabaei MS, Ahmed M. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2022;2508:115–34.

PARTE II: ARTIGO

Stroke Patient-Derived Serum Modulates Redox and Inflammatory Parameters in Astroglial Cells

Isabela Thurow Lemes¹, Andressa Schneider Lobato¹, Nathália Passos Moura¹, Fabiana da Silveira Santos Sinnott¹, Djiovana Zanini¹, Luana Born Pureza², Sofia Goulart Schaefer², Thiago Falson Santana², Eduarda Neutzling Drawanz², Aline Longoni dos Santos¹, Fernando Lopez Alvez³, Roselia Maria Spanevello³, Francieli Moro Stefanello³, Daniele Schauen da Costa⁴, Aline Daniel Moreira de Moraes⁴, Izaviany Schmitz⁴, Caio César Ramalho Bezerra⁴, Larissa Daniele Bobermin⁴, André Quincozes-Santos⁴, Diogo Onofre Souza⁴, Adriano Martimbianco de Assis^{1*}

¹ Graduate Program in Health and Behavior, Laboratory of Clinical Neurosciences – Catholic University of Pelotas (UCPel), Pelotas, RS, Brazil;

² Center of Health Sciences – Catholic University of Pelotas (UCPel), CEP 96015560, Pelotas, RS, Brazil;

³ Graduate Program in Biochemistry and Bioprospecting, Laboratory of Neurochemistry, Inflammation and Cancer, Center of Chemical, Pharmaceutical and Food Sciences – Federal University of Pelotas (UFPe), CEP 9601090, Pelotas, RS, Brazil.

⁴ Graduate Program in Biological Sciences: Biochemistry, Institute of Basic Health Sciences – Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil.

*** Corresponding author**

Adriano Martimbianco de Assis (adriano.assis@ucpel.edu.br)

Graduate Program in Health and Behavior, Center of Health Sciences, Catholic University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil.

Rua Gonçalves Chaves 373, room 324C 96015560

Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil.

Phone: +55 53 2128 8031

1. INTRODUCTION

Stroke is the second leading cause of death and disability worldwide, affecting 15 million people annually, with one-third experiencing permanent disability (Saini et al., 2021). Beyond the high number of affected individuals and associated healthcare costs, the resulting functional disability progressively worsens (Kuriakose and Xiao, 2020). Ischemic stroke (IS) accounts for approximately 87% of cases. Cerebral blood flow obstruction initiates a cascade of events beginning with local hypoxia (Yao et al., 2024), leading to reduced adenosine triphosphate (ATP) and impaired astroglial processes (Flood et al., 2023). These disruptions result in reactive oxygen species (ROS) production, inflammation, neurotoxicity, neuroinflammation (Zhu et al., 2022), lactic acidosis, glutamate and aspartate accumulation, calcium channel dysfunction, and lipase and protease activation (Majumder, 2024).

The cascade of events disrupting brain homeostasis, including excitotoxicity from altered glutamate metabolism, triggers astroglial activation. In response to microenvironmental changes, astrocytes provide neuronal support, including neurotrophic factors (Orellana-Urzuu et al., 2020). However, astrocytes can also contribute to harmful effects, such as increased ROS and pro-inflammatory cytokine expression (Chouchani et al., 2014). Inflammatory factors can regulate glial cell redox states; oxygen and glucose deprivation increase ROS production, primarily by mitochondria, stimulating pro-inflammatory gene expression (Jurcau and Simion, 2021). Following the initial expression of pro-inflammatory factors, further cytokine release in the infarcted area contributes to lesion progression and worse outcomes (Maida et al., 2020). The release of inflammatory cytokines, in turn, also induces various harmful changes in the central nervous system (CNS), including oxidative stress. Oxidative stress, characterized by an imbalance between ROS production and neutralization capacity, expands the infarct lesion, mediates secondary brain injury (penumbra), and interacts with numerous pathological processes (Yang et al., 2019). In IS, oxidative stress is complex, involving metabolic dysregulation, reactive astrocytes, and compromised neurovascular interactions (Zhu et al., 2022). These stressful conditions significantly alter astrocytic function, affecting mitochondrial metabolism, regulating the redox state, influencing reactive astrocytes and glial scar formation, and contributing to neuroinflammation (Chamorro et al., 2016).

The aforementioned biochemical processes culminate in cell damage or death. Membrane disintegration releases intracellular contents into the extracellular medium, allowing these compounds to enter the bloodstream and trigger adverse biological responses (Kim et al., 2022). Therefore, acute-phase ischemic stroke serum is hypothesized to contain substances capable of activating inflammatory pathways and inducing oxidative stress. To our knowledge, no studies have previously used human serum to evaluate the effects of ischemic stroke on astroglial cells. This study aimed to evaluate the effects of culture medium supplemented with acute-phase ischemic stroke patient serum on oxidative stress and inflammatory parameters in the astroglial C6 cell line.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Materials

Cell culture materials—Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), and other cell culture supplies—were purchased from Gibco (Carlsbad, CA, USA). Qualitrol 1H was obtained from Labtest Diagnósticos SA (Lagoa Santa, MG, Brazil), and methylthiazolyldiphenyltetrazolium bromide (MTT) was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Other reagents were obtained from local suppliers.

2.2 Study design

This study was developed in two stages in a reverse translational research model (Fig. 1). Initially, control and standardization conditions were performed to confirm the internal validity of the experiments. Only the groups most relevant to the central research hypothesis were maintained to refine the experimental design, aiming for greater interpretability and a clearer focus on the human biological aspects related to the effects of ischemic serum exposure.

2.2.1 Stage I

The serum used to supplement the culture medium was obtained from a case-control study approved by the Catholic University of Pelotas Research Ethics Committee under approval number 6,433,569. In this study, all participants who agreed

to participate signed the informed consent form. The case group included patients of both sexes, over 18 years of age, diagnosed with IS (between the third and seventh day after diagnosis). The control group consisted of individuals matched by sex and age and recruited from the community, with no history of stroke. Patients with previous ischemic stroke with sequelae, motor impairment, cognitive difficulties in understanding the instrument, neuroinflammatory or neurodegenerative diseases, and recent traumatic brain injury were excluded from both groups. Patients completed a questionnaire with questions about identification data, sociodemographic and health profiles, and also assessed their socioeconomic status using the scale of the Brazilian Association of Research Companies (ABEP) (Bender et al., 2024). This scale is based on the sum of material assets and other items, where “A” represents the highest socioeconomic level and “E” is the lowest. All patients underwent venipuncture of approximately 15 mL of blood in a vacuum tube with a clot activator, followed by centrifugation at 3500 rpm for 15 minutes at 21°C to extract the serum, which was stored at -80°C until the time of cell treatment.

2.2.1.1 Biochemical analyses in the serum of individuals

Aliquots of the same samples were sent to partner laboratories for metabolic profile analysis, including parameters such as triglycerides, total cholesterol, low-density lipoprotein (LDL), high-density lipoprotein (HDL), blood glucose, ultrasensitive C-reactive protein (CRP), and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α). The first five were analyzed using the colorimetric enzymatic method (Labtest Diagnósticos SA, Brazil), while the last two were analyzed using immunoturbidimetry and chemiluminescence, respectively (Invitrogen, USA).

2.2.2 Stage II

The C6 astroglial cell line was obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA) and maintained in flasks at 37°C with 5% CO₂ in DMEM containing 0.1% amphotericin B and 0.032% gentamicin, in addition to 5% FBS until they reached confluence to receive the treatments in plates.

The cells were exposed to groups with different serum supplements in the culture medium for 24 hours (Figure 1). To evaluate the effects of human serum, one group was treated with culture medium added with 5% of *pooled* sera from all patients

diagnosed with ischemic stroke (Montenegro et al., 2023), while to evaluate a human control, the group was treated with culture medium added with 5% of *pooled* sera from all patients without the diagnosis.

After 24 hours of exposure, cellular viability, oxidative stress parameters, and the expression of inflammatory pathways were evaluated using the methods described below. The aim was to investigate the effects of exposure to human serum, especially after stroke, on characteristics frequently altered in diagnosed patients.

2.2.2.1 Cellular Viability

Evaluated through an MTT reduction assay, applied at a volume of 3 μ l per well (final concentration: 50 μ g/ml) and maintained under the conditions mentioned above for 0.5 hour. After removing the culture medium, dimethyl sulfoxide (DMSO) was used to dissolve the crystals (Bobermin et al., 2012). The results were calculated using the absorbance values, which are expressed in percentages relative to the basal group (control value).

2.2.2.2 Glutamine Synthetase

To evaluate glutamine synthetase (GS) activity, the cells were lysed in a potassium chloride solution (KCl 150 mM) and after homogenization in a reaction mixture, the sample was centrifuged and the absorbance of the supernatant was measured at 530 nm and compared to a calibration curve, with subsequent adjustment by the protein value, as described in Bobermin et al. (2012).

2.2.2.3 Antioxidant Analysis

Extracellular glutathione (GSH) levels were measured as described in Quincozes-Santos, et al. 2009, with cells previously lysed in KCl phosphate (Quincozes-Santos et al., 2009). For catalase (CAT) quantification, samples were homogenized in 0.1% Triton X-100 and stored for 24 hours for subsequent continuation of the protocol. Kinetic values were evaluated at 240 nm after the addition of 20 mM hydrogen peroxide (H_2O_2) buffer. To evaluate superoxide dismutase (SOD) activity, samples were added with 5 μ l of catalase and diluted in glycine buffer to evaluate kinetics at 480 nm after addition of 10 μ l of adrenaline solution. SOD and CAT values were adjusted according to protein dosage, which was performed using the method described by Lowry (Lowry et al., 1951).

2.2.2.4 Quantitative RT-PCR

To evaluate inflammatory response and signaling pathways, total RNA from cells was isolated using Trizol and subsequently synthesized into cDNA by the High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit. (Bobermin et al., 2024), The expression of target genes was determined using the TaqMan real-time PCR system for cyclooxygenase 2 (COX2; Rn01483828_m1), inducible nitric oxide synthase (iNOS; Rn00561646_m1), interleukin-1 β (IL-1 β ; Rn00580432_m1), interleukin-6 (IL-6; Rn01410330_m1), nuclear factor erythroid-derived 2 (Nrf2; Rn00582415_m1), NF κ B p65subunit (NF κ B p65; #Rn01502266_m1) and tumor necrosis factor α (TNF- α ; Rn99999017_m1). mRNA levels of target genes were normalized to β -actin levels (Rn00667869_m1). The results were analyzed employing the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (Livak KJ, Schmittgen TD, 2001).

2.3 Statistical analysis

Data were analyzed using the *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS) version 25.0 and graphs were generated using *GraphPad Prism* 10.4 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA). The normality of numerical variables was tested using the Shapiro-Wilk and Kolmogorov-Smirnov tests, where p-values > 0.05 indicated normal distribution. Variables with non-normal distribution were analyzed using the Mann-Whitney test and frequencies were expressed as median and 25/75 interquartile range. For variables with normal distribution, statistical comparisons between two groups were performed using Student's t-test and expressed as mean and standard deviation. Associations were considered statistically significant when $p \leq 0.05$.

3. RESULTS

3.1 Sociodemographic Characteristics and Serum Analysis

A total of 19 serum samples were used, comprising 9 cases and 10 controls. Both groups were predominantly male, representing 66.7% ($n = 6$) of the cases and 70% ($n = 7$) of the controls (Table 1). The majority of participants were white, 88.9% ($n = 8$) in the case group and 60% ($n = 6$) in the control group. The mean age was 59.33 ± 17.5 years for the cases and 57.30 ± 18.7 years for the controls. In terms of education, all

patients in the case group had completed elementary school. Among the controls, 40% (n = 4) had completed higher education or more, while 50% (n = 5) had completed elementary school. The predominant socioeconomic class among patients in the case group was class DE, considered low or vulnerable, representing 55.6% (n = 5). In the control group, the predominant class was C, classified as lower-middle class, accounting for 50% (n = 5) (Table 1). Regarding clinical and health characteristics, 44.4% (n = 4) of the case group were hypertensive, 55.6% (n = 5) were smokers, and only 11.1% (n = 1) had type 2 diabetes. In the control group, 40.0% (n = 4) were hypertensive, only 10.0% (n = 1) were smokers, and none had type 2 diabetes.

Lipid profile analyses revealed significant differences between the groups when comparing the medians of total cholesterol ($p = 0.005$), LDL ($p = 0.043$), and HDL ($p < 0.001$), indicating that lipid levels were higher in the control group compared to the cases. However, although differences were observed between the two groups, the values for the control group remained within the reference ranges for all parameters. Blood glucose levels were higher in patients with ischemic stroke ($p = 0.035$), as well as CRP levels ($p = 0.011$), when compared to the controls (Table 2).

3.3 Changes in cellular morphology and viability

Cell morphology was observed (Fig. 2A). After assessing cell viability using the MTT assay, there were no significant differences in the reductions in viability between the groups treated with stroke serum and human control serum (Fig. 2B, $p = 0.571$). Additionally, no significant changes were observed in GS activity (Fig. 2C, $p = 0.954$), an enzyme present only in astroglial cells in the CNS.

3.4 Assessment of oxidative stress parameters

Supplementation of the cell culture medium with human serum, irrespective of association with an ischemic event, did not produce significant differences among the groups in the gene expression of the transcription factor Nrf2, a master regulator of redox homeostasis (Fig. 3A, $p = 0.947$). Conversely, a significant reduction was observed in GSH levels (Fig. 3B, $p = 0.017$), CAT activity (Fig. 3C, $p = 0.044$), and SOD activity in the group treated with ischemic serum compared to the control group (Fig. 3D, $p < 0.001$).

3.5 Changes in inflammatory gene expression

There were no significant differences ($p > 0.05$) in the expression of IL-1 β (Fig. 4A), TNF- α (Fig. 4C), or NF κ B (Fig. 4F). However, supplementation of the culture medium with serum from the ischemic stroke group in C6 astroglial cells significantly increased the expression of IL-6 (Fig. 4B), iNOS (Fig. 4D), and COX2 (Fig. 4E) compared to the control group ($p < 0.05$.)

4. DISCUSSION

Using a reverse translational approach, this study provides new insights into the cellular and molecular effects of human ischemic stroke serum on astroglial cells. Unlike conventional translational research, which progresses from preclinical models to clinical applications, reverse translational models originate from clinical observations, leveraging real-world biological complexity to generate mechanistic hypotheses (Bosetti et al., 2017; Shakhnovich, 2018). Through this approach, we demonstrated that exposure of astroglial C6 cells to serum from stroke patients selectively modulated redox status and robustly activated key inflammatory pathways.

A major finding of this study is the significant upregulation of pro-inflammatory mediators, notably iNOS, COX2, and IL-6, in astroglial cells exposed to ischemic serum. This inflammatory signature mirrors the pathological processes observed *in vivo*, where reactive astrocytes contribute to secondary injury through cytokine secretion (Candelario-Jalil et al., 2022; Gertz et al., 2012; Nogawa et al., 1998; Wang and Tang, 2007). The elevation of these specific markers, without a concomitant rise in TNF- α , IL-1 β , or NF κ B, suggests that the serum-borne factors preferentially activate discrete signaling networks, rather than inducing a broad-spectrum inflammatory response (Ageeva et al., 2024).

Interestingly, the selective upregulation of COX2 and iNOS — enzymes involved in the production of reactive oxygen and nitrogen species — raises questions about their roles in perpetuating secondary neuroinflammation. iNOS-derived nitric oxide can exacerbate oxidative stress and mitochondrial dysfunction, while COX2 products, particularly prostaglandins, can modulate vascular tone, glial activation, and neuronal survival (Nogawa et al., 1998; Rola-Pleszczynski and Stankova, 1992; Wang and Tang, 2007).

Importantly, the observed pattern of selective cytokine induction aligns with growing evidence that astrocytes exhibit stimulus-specific responses depending on the molecular profile of the insult. For instance, prostaglandin-mediated suppression of TNF- α (Rola-Pleszczynski and Stankova, 1992) and selective NF κ B pathway modulation (Howell and Bidwell, 2020; Wang et al., 2022b; Wang et al., 2013) may contribute to the observed dissociation between COX2/iNOS upregulation and TNF- α stability. Furthermore, studies have shown that astrocytic IL-6 secretion, while traditionally associated with detrimental effects, can also engage protective signaling pathways under certain conditions (Gertz et al., 2012), highlighting the dual roles these mediators may play depending on context.

The apparent disconnection between NF κ B signaling and pro-inflammatory gene expression in this model invites further exploration. NF κ B is a central transcription factor governing inflammatory responses, and its inhibition is generally associated with reduced cytokine production (Howell and Bidwell, 2020). However, alternative pathways, including Janus Kinase / Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (JAK/STAT3), p38 Mitogen-Activated Protein Kinase (p38 MAPK), and cAMP Response Element-Binding Protein (CREB), are also capable of regulating IL-6 and COX2 expression independently of NF κ B (Chen et al., 2018; Tanaka et al., 2014), suggesting that serum-derived stimuli may preferentially engage non-canonical signaling axes in astrocytes.

Another noteworthy observation is the lack of changes in the mRNA expression of the transcription factor Nrf2, despite significant alterations in other parameters associated with oxidative stress. Exposure to ischemic serum resulted in decreased levels of key antioxidant system components, including the enzymes SOD and CAT, as well as the molecule GSH, suggesting an imbalance in the cellular redox state. This imbalance may stem from the consumption of these antioxidant defenses in response to an increased oxidative burden (Cojocaru et al., 2013). Although antioxidant enzymes were inactivated, the sustained expression of Nrf2— a master regulator of antioxidant gene networks (Jung and Kwak, 2010; Wang et al., 2022)— may indicate a state of moderate oxidative stress that is insufficient to trigger significant transcriptional activation (Al-Mubarak et al., 2021). In this context, the preserved expression of Nrf2 likely contributes to maintaining redox homeostasis under serum-induced stress conditions.

These findings contrast with results from traditional ischemia-reperfusion models, such as Middle Cerebral Artery Occlusion (MCAO) or Oxygen and Glucose Deprivation (OGD), where abrupt oxidative bursts during reperfusion typically lead to widespread oxidative damage (Ma et al., 2021; Rodrigo et al., 2013). Our model, which lacks an active ischemia-reperfusion component, instead reflects chronic systemic alterations in redox and inflammatory profiles present in the serum of stroke patients. This distinction underscores the importance of experimental context when interpreting oxidative stress outcomes in preclinical stroke research.

From a methodological standpoint, human serum introduces an additional layer of complexity. While serum-based exposure models capture clinically relevant systemic changes, they also incorporate individual variability related to metabolic, inflammatory, and vascular health (Montellano et al., 2021). Although pooled serum samples were used to mitigate individual bias, the dynamic interplay of cytokines, growth factors, and metabolites present in the serum likely contributed to the selective activation of specific cellular pathways observed in this study. The absence of ischemia and reperfusion phases in this model offers both advantages and limitations. On one hand, it isolates the effects of circulating factors independent of mechanical or hypoxic injury, allowing for the dissection of serum-specific influences. On the other hand, it does not fully replicate the multifaceted cellular environment of the ischemic brain, where mechanical stress, hypoxia, excitotoxicity, and immune infiltration occur simultaneously (Ma et al., 2021; Rodrigo et al., 2013). Some limitations should be acknowledged. First, the relatively short exposure period (24 h) may not fully capture longer-term effects of sustained systemic inflammation. Second, while pooled sera minimized individual variability, stratification of patients based on stroke severity, comorbidities, or inflammatory profiles could yield more nuanced insights.

Despite these limitations, the model introduced here offers a powerful new tool for investigating how circulating factors after stroke influence glial behavior, bridging the gap between clinical observations and mechanistic studies. By embracing biological variability rather than eliminating it, reverse translational models like this one may foster the development of more effective and personalized therapeutic strategies for stroke recovery. In conclusion, our findings highlight that serum from IS patients, even without direct ischemic injury, can drive astroglial activation toward a pro-inflammatory phenotype via selective molecular pathways. This underscores the pivotal role of

systemic factors in post-stroke neuroinflammation and opens new avenues for exploring serum-based biomarkers and therapeutic targets to mitigate secondary brain injury.

FUNDING

This work was supported by the CNPq/Brazil (404804/2021-7), CAPES (88881.710320/2022-01), and the INCT/Excitotoxicity and Neuroprotection (CNPq 465671/2014-4).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

5. REFERENCES

- Ageeva, T., Rizvanov, A., Mukhamedshina, Y., 2024. NF-kappaB and JAK/STAT Signaling Pathways as Crucial Regulators of Neuroinflammation and Astrocyte Modulation in Spinal Cord Injury. *Cells* 13.
- Al-Mubarak BR, Bell KFS, Chowdhry S, Meakin PJ, Baxter PS, McKay S, Dando O, Ashford MLJ, Gazaryan I, Hayes JD, Hardingham GE. Non-canonical Keap1-independent activation of Nrf2 in astrocytes by mild oxidative stress. *Redox Biol.* 2021 Nov;47:102158.
- Bender, L.V., Wirowski, N., Lobato, A.S., Jansen, K., Cardoso, T.A., Mondin, T.C., Oses, J.P., Kapczinski, F., Souza, L.D.M., Silva, R.A.D., Pedrotti Moreira, F., 2024. The role of metabolic syndrome as a mediator in the relationship between CCL11 levels and the presence of a mood episode with mixed features in young adults with bipolar disorder. *J Psychiatr Res* 175, 343-349.
- Bobermin, L.D., Quincozes-Santos, A., Guerra, M.C., Leite, M.C., Souza, D.O., Goncalves, C.A., Gottfried, C., 2012. Resveratrol prevents ammonia toxicity in astroglial cells. *PLoS One* 7, e52164.
- Bobermin, L.D., Sesterheim, P., da Costa, D.S., Rezena, E., Schmitz, I., da Silva, A., de Moraes, A.D.M., Souza, D.O., Wyse, A.T., Leipnitz, G., Netto, C.A., Quincozes-Santos, A., Goncalves, C.A., 2024. Simvastatin Differentially Modulates Glial Functions in Cultured Cortical and Hypothalamic Astrocytes Derived from Interferon alpha/beta Receptor Knockout mice. *Neurochem Res* 49, 732-743.
- Bosetti, F., Koenig, J.I., Ayata, C., Back, S.A., Becker, K., Broderick, J.P., Carmichael, S.T., Cho, S., Cipolla, M.J., Corbett, D., Corriveau, R.A., Cramer, S.C., Ferguson, A.R., Finklestein, S.P., Ford, B.D., Furie, K.L., Hemmen, T.M., Iadecola, C., Jakeman, L.B., Janis, S., Jauch, E.C., Johnston, K.C., Kochanek, P.M., Kohn, H., Lo, E.H., Lyden, P.D., Mallard, C., McCullough, L.D., McGavern, L.M., Meschia, J.F., Moy, C.S., Perez-Pinzon, M.A., Ramadan, I., Savitz, S.I., Schwamm, L.H., Steinberg, G.K., Stenzel-Poore, M.P., Tymianski, M., Warach, S., Wechsler, L.R., Zhang, J.H., Koroshetz, W., 2017. Translational Stroke Research: Vision and Opportunities. *Stroke* 48, 2632-2637.
- Candelario-Jalil, E., Dijkhuizen, R.M., Magnus, T., 2022. Neuroinflammation, Stroke, Blood-Brain Barrier Dysfunction, and Imaging Modalities. *Stroke* 53, 1473-1486.

- Chamorro, A., Dirnagl, U., Urra, X., Planas, A.M., 2016. Neuroprotection in acute stroke: targeting excitotoxicity, oxidative and nitrosative stress, and inflammation. *Lancet Neurol* 15, 869-881.
- Chen, L., Deng, H., Cui, H., Fang, J., Zuo, Z., Deng, J., Li, Y., Wang, X., Zhao, L., 2018. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget* 9, 7204-7218.
- Chouchani, E.T., Pell, V.R., Gaude, E., Aksentijevic, D., Sundier, S.Y., Robb, E.L., Logan, A., Nadtochiy, S.M., Ord, E.N.J., Smith, A.C., Eyassu, F., Shirley, R., Hu, C.H., Dare, A.J., James, A.M., Rogatti, S., Hartley, R.C., Eaton, S., Costa, A.S.H., Brookes, P.S., Davidson, S.M., Duchon, M.R., Saeb-Parsy, K., Shattock, M.J., Robinson, A.J., Work, L.M., Frezza, C., Krieg, T., Murphy, M.P., 2014. Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. *Nature* 515, 431-435.
- Cojocaru IM, Cojocaru M, Sapira V, Ionescu A. Evaluation of oxidative stress in patients with acute ischemic stroke. *Rom J Intern Med*. 2013 Apr-Jun;51(2):97-106.
- Flood, D., Lee, E.S., Taylor, C.T., 2023. Intracellular energy production and distribution in hypoxia. *J Biol Chem* 299, 105103.
- Howell, J.A., Bidwell, G.L., 3rd, 2020. Targeting the NF-kappaB pathway for therapy of ischemic stroke. *Ther Deliv* 11, 113-123.
- Jung, K.A., Kwak, M.K., 2010. The Nrf2 system as a potential target for the development of indirect antioxidants. *Molecules* 15, 7266-7291.
- Jurcau, A., Simion, A., 2021. Neuroinflammation in Cerebral Ischemia and Ischemia/Reperfusion Injuries: From Pathophysiology to Therapeutic Strategies. *Int J Mol Sci* 23.
- Kim, K.Y., Shin, K.Y., Chang, K.A., 2022. Potential Biomarkers for Post-Stroke Cognitive Impairment: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Int J Mol Sci* 23.
- Kuriakose, D., Xiao, Z., 2020. Pathophysiology and Treatment of Stroke: Present Status and Future Perspectives. *Int J Mol Sci* 21.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8

- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275.
- Ma, Q., Wang, C., Wang, M., Li, Y., Li, P., Wang, J., Cheng, L., An, Y., Dai, H., Duan, Y., Wang, T., Zhao, B., 2021. Investigation of brain damage mechanism in middle cerebral artery occlusion/reperfusion rats based on i-TRAQ quantitative proteomics. *Exp Brain Res* 239, 1247-1260.
- Maida, C.D., Norrito, R.L., Daidone, M., Tuttolomondo, A., Pinto, A., 2020. Neuroinflammatory Mechanisms in Ischemic Stroke: Focus on Cardioembolic Stroke, Background, and Therapeutic Approaches. *Int J Mol Sci* 21.
- Majumder, D., 2024. Ischemic Stroke: Pathophysiology and Evolving Treatment Approaches. *Neurosci Insights* 19, 26331055241292600.
- Montellano, F.A., Ungethum, K., Ramiro, L., Nacu, A., Hellwig, S., Fluri, F., Whiteley, W.N., Bustamante, A., Montaner, J., Heuschmann, P.U., 2021. Role of Blood-Based Biomarkers in Ischemic Stroke Prognosis: A Systematic Review. *Stroke* 52, 543-551.
- Montenegro, Y.H.A., Bobermin, L.D., Sesterheim, P., Salvato, R.S., Anschau, F., de Oliveira, M.J.S., Wyse, A.T.S., Netto, C.A., Goncalves, C.S., Quincozes-Santos, A., Leipnitz, G., 2023. Serum of COVID-19 patients changes neuroinflammation and mitochondrial homeostasis markers in hippocampus of aged rats. *J Neurovirol* 29, 577-587.
- Nogawa, S., Forster, C., Zhang, F., Nagayama, M., Ross, M.E., Iadecola, C., 1998. Interaction between inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 after cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 10966-10971.
- Orellana-Urzuu, S., Rojas, I., Libano, L., Rodrigo, R., 2020. Pathophysiology of Ischemic Stroke: Role of Oxidative Stress. *Curr Pharm Des* 26, 4246-4260.
- Quincozes-Santos, A., Nardin, P., de Souza, D.F., Gelain, D.P., Moreira, J.C., Latini, A., Goncalves, C.A., Gottfried, C., 2009. The janus face of resveratrol in astroglial cells. *Neurotox Res* 16, 30-41.
- Rodrigo, R., Fernandez-Gajardo, R., Gutierrez, R., Matamala, J.M., Carrasco, R., Miranda-Merchak, A., Feuerhake, W., 2013. Oxidative stress and pathophysiology of ischemic stroke: novel therapeutic opportunities. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 12, 698-714.

Rola-Pleszczynski, M., Stankova, J., 1992. Cytokine gene regulation by PGE(2), LTB(4) and PAF. *Mediators Inflamm* 1, 5-8.

Saini, V., Guada, L., Yavagal, D.R., 2021. Global Epidemiology of Stroke and Access to Acute Ischemic Stroke Interventions. *Neurology* 97, S6-S16.

Shakhnovich, V., 2018. It's Time to Reverse our Thinking: The Reverse Translation Research Paradigm. *Clin Transl Sci* 11, 98-99.

Tanaka, T., Narazaki, M., Kishimoto, T., 2014. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6, a016295.

Wang, L., Zhang, X., Xiong, X., Zhu, H., Chen, R., Zhang, S., Chen, G., Jian, Z., 2022a. Nrf2 Regulates Oxidative Stress and Its Role in Cerebral Ischemic Stroke. *Antioxidants (Basel)* 11.

Wang, P., Li, C., Liao, G., Huang, Y., Lv, X., Liu, X., Chen, W., Zhang, L., 2022b. Vanillin Attenuates Proinflammatory Factors in a tMCAO Mouse Model via Inhibition of TLR4/NF- κ B Signaling Pathway. *Neuroscience* 491, 65-74.

Wang, Y., Cao, M., Liu, A., Di, W., Zhao, F., Tian, Y., Jia, J., 2013. Changes of inflammatory cytokines and neurotrophins emphasized their roles in hypoxic-ischemic brain damage. *Int J Neurosci* 123, 191-195.

Wang, Z.F., Tang, X.C., 2007. Huperzine A protects C6 rat glioma cells against oxygen-glucose deprivation-induced injury. *FEBS Lett* 581, 596-602.

Yang, C., Hawkins, K.E., Dore, S., Candelario-Jalil, E., 2019. Neuroinflammatory mechanisms of blood-brain barrier damage in ischemic stroke. *Am J Physiol Cell Physiol* 316, C135-C153.

Yao, H., Tian, J., Cheng, S., Dou, H., Zhu, Y., 2024. The mechanism of hypoxia-inducible factor-1 α enhancing the transcriptional activity of transferrin ferroportin 1 and regulating the Nrf2/HO-1 pathway in ferroptosis after cerebral ischemic injury. *Neuroscience* 559, 26-38.

Table 1. Descriptive analysis of the sociodemographic profile of the individuals that made up the sample

Independent variables	Total sample (N=19)	Cases (N=9)	Controls (N=10)
Sex ^a			
Feminine	6 (31.6)	3 (33.3)	3 (30.0)
Masculine	13 (68.4)	6 (66.7)	7 (70.0)
Skin color ^a			
White	14 (73.7)	8 (88.9)	6 (60.0)
Non-white	5 (26.3)	1 (11.1)	4 (40.0)
Age (years) ^b	58.26 (17.6)	59.33 (17.5)	57.3 (18.7)
Education ^a			
Until completion of elementary school	14 (73.7)	9 (100.0)	5 (50.0)
Until high school is complete	1 (5.3)	0	1 (10.0)
Higher education or more	4 (21.0)	0	4 (40.0)
Socioeconomic classification ^a			
B	4 (21.1)	0	4 (40.0)
C	9 (47.4)	4 (44.4)	5 (50.0)
DE	6 (31.6)	5 (55.6)	1 (10.0)
Hypertension ^a			
Yes	8 (42.1)	4 (44.4)	4 (40.0)
No	11 (57.9)	5 (55.6)	6 (60.0)
Type 2 Diabetes Mellitus ^a			
Yes	1 (5.3)	1 (11.1)	0 (0.0)
No	18 (94.7)	8 (88.9)	10 (100.0)
Smoking ^a			
Yes	6 (31.6)	5 (55.6)	1 (10.0)

No 13 (68.4) 4 (44.4) 9 (90.0)

^a Descriptive analysis represented by absolute (n) and relative (%) frequency

^b Descriptive analysis expressed as mean and standard deviation

Table 2. Comparative analysis of lipid profiles and inflammatory parameters between cases and controls.

Independent variables ^a	Cases	Controls	p-value
Glucose (mg/dl)	111,000 (104,000 - 125,000)	93,000 (85,000 - 110,000)	0.035*
Total Cholesterol (mg/dl)	120,000 (107,000 - 162,000)	174,000 (161,000 - 179,000)	0.004*
LDL (mg/dl)	59,000 (50,000 - 94,000)	96,500 (88,000 - 118,000)	0.035*
HDL (mg/dl)	32,000 (31,000 - 38,000)	49,500 (45,000 - 54,000)	<0.001*
Triglycerides (mg/dl)	128,000 (108,000 - 165,000)	97,500 (82,000 - 137,000)	0.315
Ultrasensitive PCR (mg/l)	13,500 (6,410 - 41,840)	2,500 (1,770 - 2,880)	0.022*
TNF- α (pg/ml)	15,600 (9,700 - 20,300)	10,400 (9,500 - 11,600)	0.079

LDL - Low-density lipoprotein; HDL - High-density lipoprotein; CRP - C-reactive protein; TNF- α - Tumor necrosis factor alpha.

^a Mann-Whitney analysis, represented by median and interquartile ranges

*Statistically significant associations

Figure 1. Overview of the study stages using a reverse translational research model. Schematic representation of the experimental workflow, highlighting the application of human-derived serum to astroglial cell cultures and subsequent analysis of cellular and molecular responses.

Figure 1

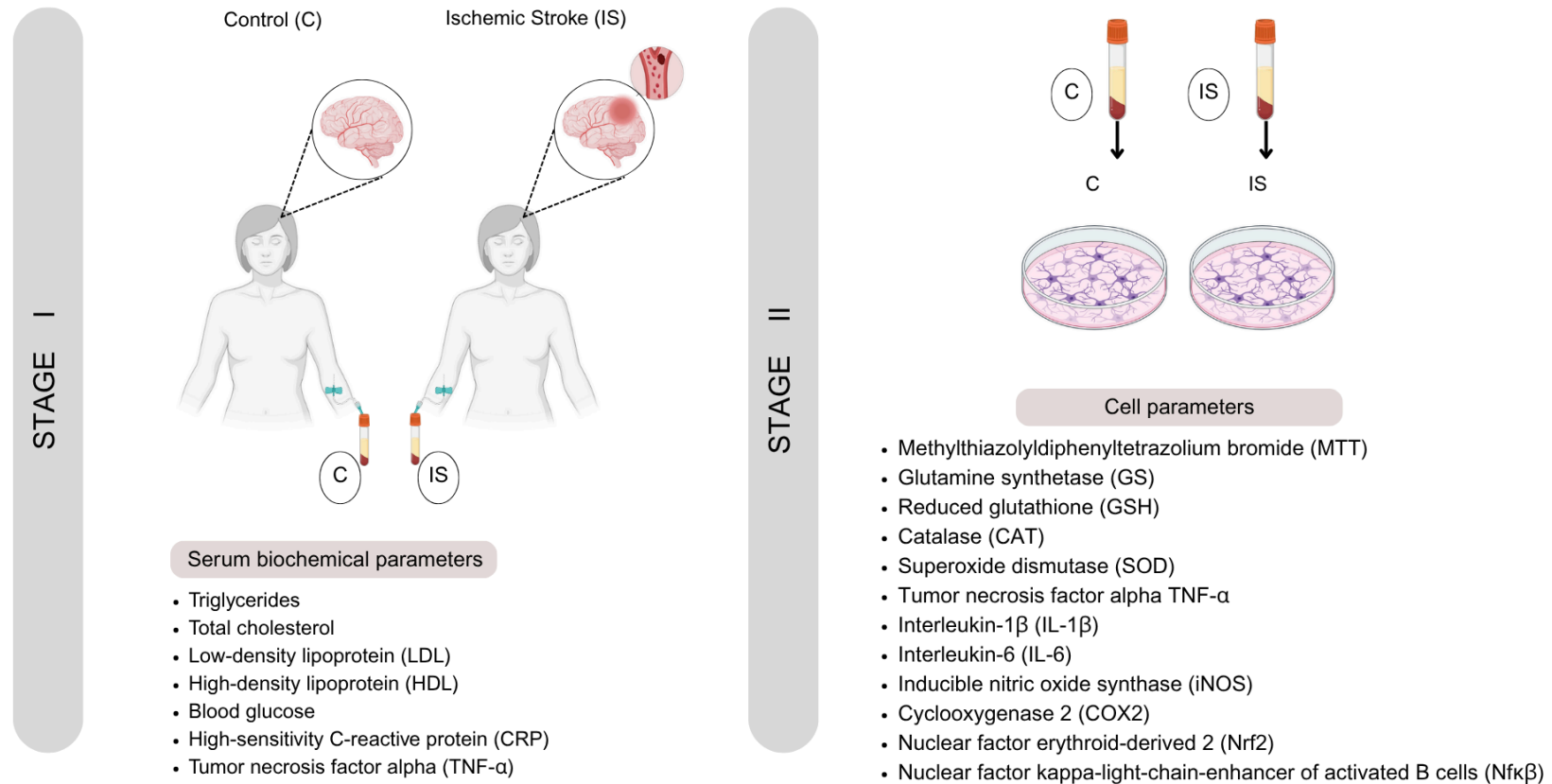


Figure 2. Effects of 24-hour exposure to serum from ischemic stroke patients on C6 astroglial cells. (a) Representative images showing changes in C6 cell morphology following treatment. (b) Cell viability was assessed by MTT reduction after exposure to ischemic stroke patient serum ($p = 0.571$). (c) Glutamine synthetase (GS) enzymatic activity, expressed as $\mu\text{mol}/\text{mg protein}/\text{h}$ ($p = 0.954$). Data are presented as mean $\pm$ S.D. from at least nine independent experiments. Statistical comparisons between the two groups were performed using Student's t-test. Statistical significance was set at $p < 0.05$.

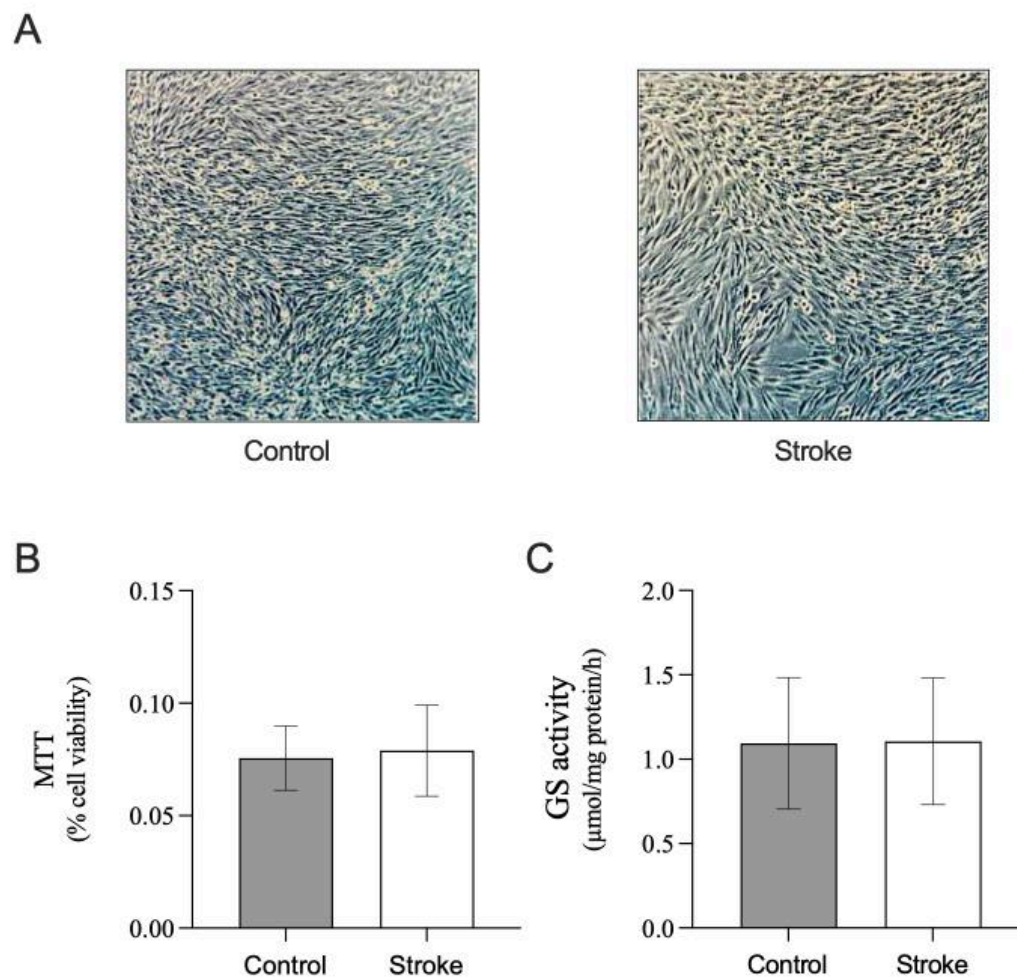


Figure 3. Oxidative stress markers in C6 astroglial cells after 24-hour exposure to serum from ischemic stroke patients. a) Nrf2 mRNA expression ($p = 0.947$). b) GSH levels expressed as nmol/mg protein ($p = 0.017$). c) Catalase (CAT) activity expressed as Units/mg protein ($p = 0.044$). d) Superoxide dismutase (SOD) activity expressed as Units/mg protein ($p < 0.001$). Data represent mean $\pm$ S.D. from at least nine independent experiments. Statistical comparisons between the two groups were performed using Student's t-test. P-values < 0.05 were considered statistically significant.

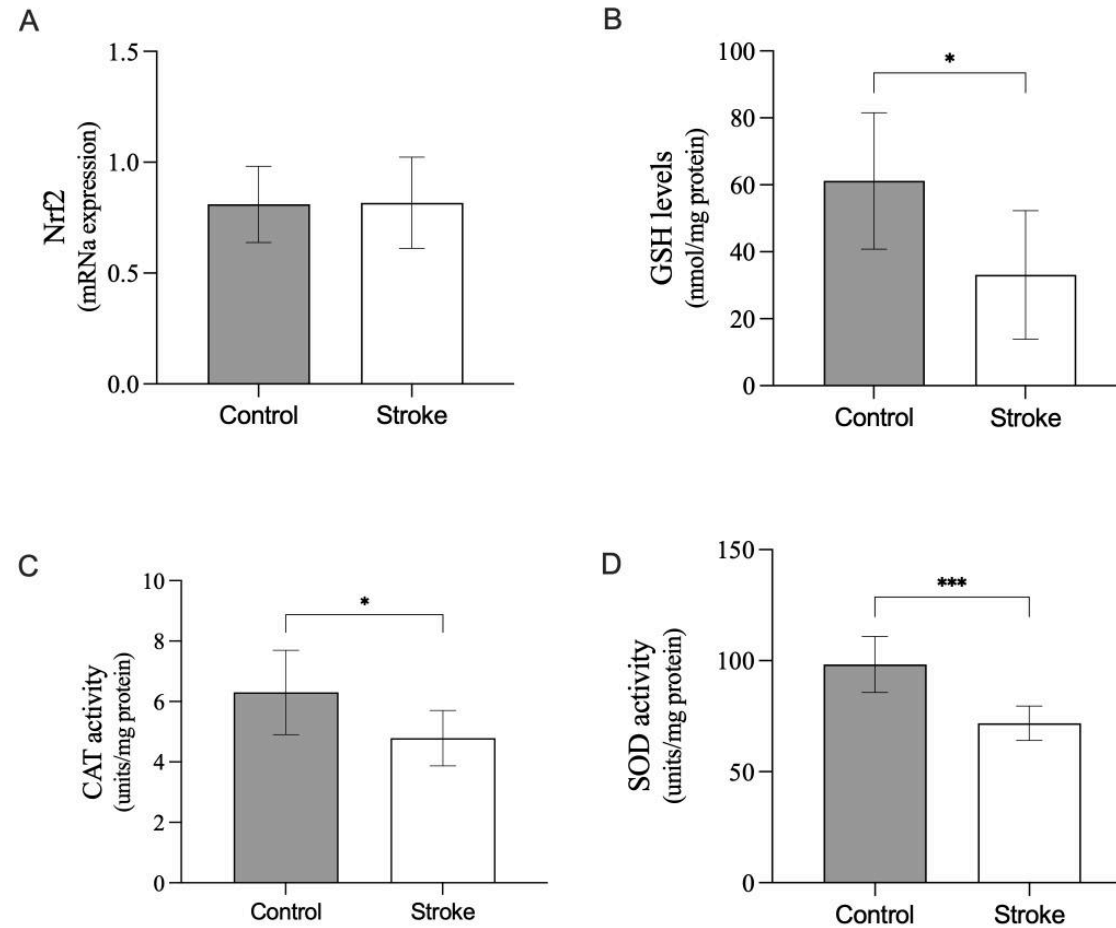
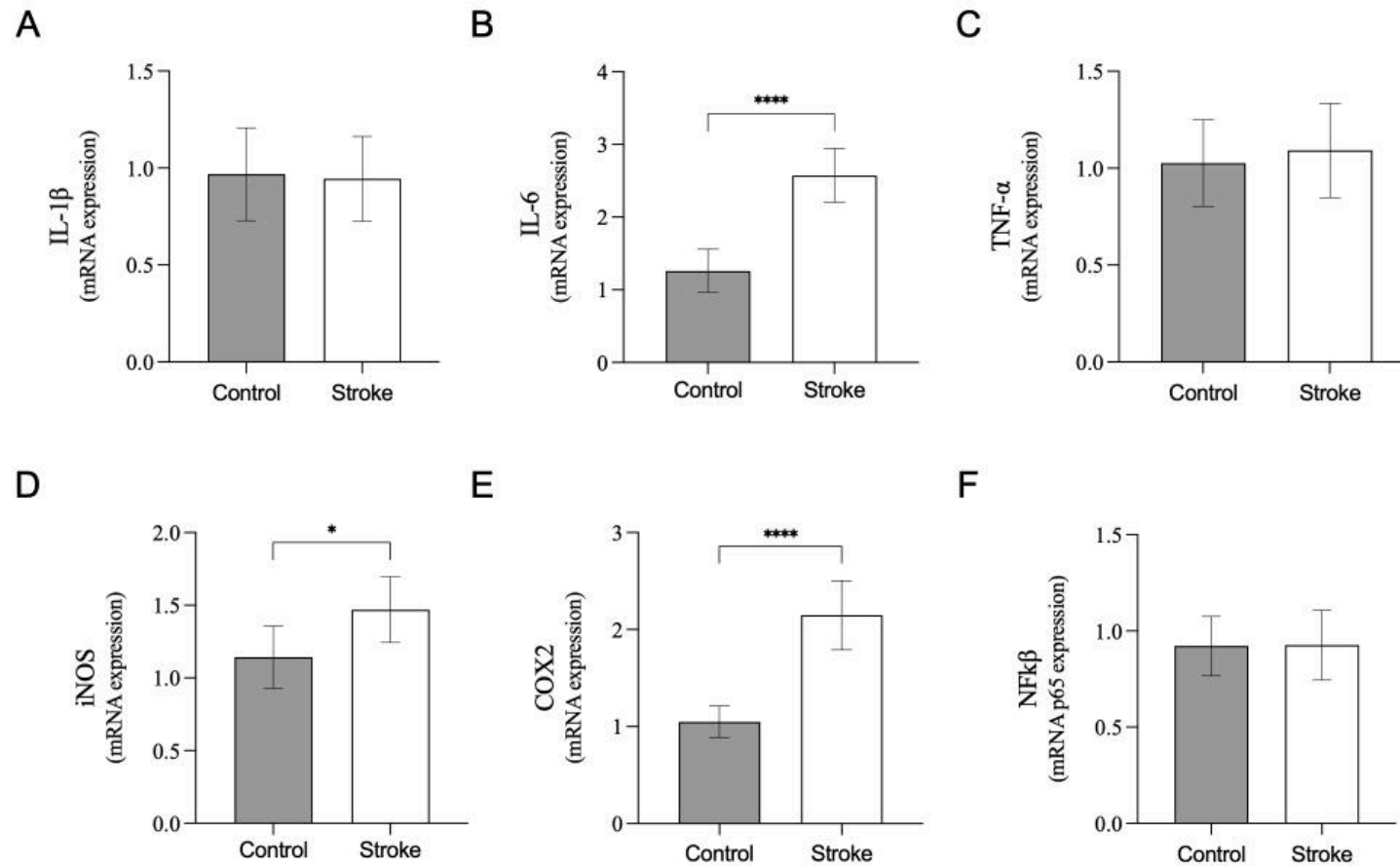


Figure 4. Expression of inflammatory markers in C6 astroglial cells after 24-hour exposure to serum from ischemic stroke patients. a) IL-1 β mRNA expression ($p = 0.839$) b) IL-6 mRNA expression ($p < 0.001$). c) TNF- α mRNA expression ($p = 0.586$). d) iNOS mRNA expression ($p = 0.029$). e) COX2 mRNA expression ($p < 0.001$). f) NF κ B mRNA expression ($p = 0.956$). Data are presented as mean $\pm$ S.D. from at least eight independent experiments. Statistical comparisons between the two groups were performed using Student's t-test. P-values < 0.05 were considered statistically significant.



PARTE III: CONSIDERAÇÕES FINAIS

O artigo resultante desta dissertação visou avaliar os efeitos, sob o estresse oxidativo e parâmetros inflamatórios, a partir da adição de 5% do soro de pacientes diagnosticados com AVCi na fase aguda ao meio de cultivo de uma linhagem celular C6 tipo-astrócitos. Os resultados encontrados demonstram que a exposição das células ao soro destes pacientes gerou elevações substanciais na expressão de parâmetros inflamatórios, além de trazer a redução de uma enzima antioxidante.

Alguns dos resultados mostraram-se diferentes do que comumente acontece em outros modelos de mimetização do evento isquêmico, por isso, é importante ressaltar que até o presente momento, nenhum estudo, havia utilizado este modelo de tratamento em reproduções *in vitro* de eventos isquêmicos.

Essa diferença apresentada entre os resultados encontrados e os demais modelos de pesquisa disponíveis atualmente, evidencia que a variabilidade das respostas humanas, presentes no ambiente clínico e influenciadas por uma série de fatores extrínsecos e intrínsecos seja uma oportunidade para explorar mecanismos, esclarecer vias bioquímicas e metabólicas ainda não tão exploradas.

Descobertas a partir de modelos que invertem o curso habitual das pesquisas, levando a clínica de volta para a bancada, segundo FitzGerald, podem fazer com que estudos de fenotipagem superficial em larga escala, causada por experimentações controladas, tornem-se estudos de fenotipagem “profunda” e direcionada (43) a partir de resultados diversos que os fatores humanos proporcionam.

REFERÊNCIAS DA DISSERTAÇÃO

1. Saini V, Guada L, Yavagal DR. Global Epidemiology of Stroke and Access to Acute Ischemic Stroke Interventions. *Neurology*. 16 de novembro de 2021;97(20_Supplement_2):S6–16.
2. Kuriakose D, Xiao Z. Pathophysiology and Treatment of Stroke: Present Status and Future Perspectives. *Int J Mol Sci*. 15 de outubro de 2020;21(20):7609.
3. Zhu G, Wang X, Chen L, Lenahan C, Fu Z, Fang Y, et al. Crosstalk Between the Oxidative Stress and Glia Cells After Stroke: From Mechanism to Therapies. *Front Immunol*. 2022;13:852416.
4. Orellana-Urzúa S, Rojas I, Libano L, Rodrigo R. Pathophysiology of Ischemic Stroke: Role of Oxidative Stress. *Curr Pharm Des*. 2020;26(34):4246–60.
5. Chouchani ET, Pell VR, Gaude E, Aksentijević D, Sundier SY, Robb EL, et al. Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. *Nature*. 20 de novembro de 2014;515(7527):431–5.
6. Jurcau A, Simion A. Neuroinflammation in Cerebral Ischemia and Ischemia/Reperfusion Injuries: From Pathophysiology to Therapeutic Strategies. *Int J Mol Sci*. 21 de dezembro de 2021;23(1):14.
7. Maida CD, Norrito RL, Daidone M, Tuttolomondo A, Pinto A. Neuroinflammatory Mechanisms in Ischemic Stroke: Focus on Cardioembolic Stroke, Background, and Therapeutic Approaches. *Int J Mol Sci*. 4 de setembro de 2020;21(18):6454.
8. Yang C, Hawkins KE, Doré S, Candelario-Jalil E. Neuroinflammatory mechanisms of blood-brain barrier damage in ischemic stroke. *Am J Physiol - Cell Physiol*. 1º de fevereiro de 2019;316(2):C135–53.
9. Chamorro Á, Dirnagl U, Urra X, Planas AM. Neuroprotection in acute stroke: targeting excitotoxicity, oxidative and nitrosative stress, and inflammation. *Lancet Neurol*. julho de 2016;15(8):869–81.
10. Kim KY, Shin KY, Chang KA. Potential Biomarkers for Post-Stroke Cognitive Impairment: A Systematic Review and Meta-Analysis - PMC [Internet]. 2022 [citado 23 de outubro de 2023]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8775398/>
11. Bobermin LD, Quincozes-Santos A, Guerra MC, Leite MC, Souza DO, Gonçalves CA, et al. Resveratrol Prevents Ammonia Toxicity in Astroglial Cells. *PLOS ONE*. 21 de dezembro de 2012;7(12):e52164.

12. Quincozes-Santos A, Nardin P, de Souza DF, Gelain DP, Moreira JC, Latini A, et al. The janus face of resveratrol in astroglial cells. *Neurotox Res.* julho de 2009;16(1):30–41.
13. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* novembro de 1951;193(1):265–75.
14. Bobermin LD, Sesterheim P, da Costa DS, Rezena E, Schmitz I, da Silva A, et al. Simvastatin Differentially Modulates Glial Functions in Cultured Cortical and Hypothalamic Astrocytes Derived from Interferon α/β Receptor Knockout mice. *Neurochem Res.* 1º de março de 2024;49(3):732–43.
15. Candelario-Jalil E, Dijkhuizen RM, Magnus T. Neuroinflammation, Stroke, Blood-Brain Barrier Dysfunction, and Imaging Modalities. *Stroke.* maio de 2022;53(5):1473–86.
16. Wang ZF, Tang XC. Huperzine A protects C6 rat glioma cells against oxygen-glucose deprivation-induced injury. *FEBS Lett.* 20 de fevereiro de 2007;581(4):596–602.
17. Nogawa S, Forster C, Zhang F, Nagayama M, Ross ME, Iadecola C. Interaction between inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 after cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1º de setembro de 1998;95(18):10966–71.
18. Gertz K, Kronenberg G, Kälén RE, Baldinger T, Werner C, Balkaya M, et al. Essential role of interleukin-6 in post-stroke angiogenesis. *Brain J Neurol.* junho de 2012;135(Pt 6):1964–80.
19. Hoshino T, Ishizuka K, Toi S, Mizuno T, Nishimura A, Takahashi S, et al. Atherogenic Dyslipidemia and Residual Vascular Risk After Stroke or Transient Ischemic Attack. *Stroke.* janeiro de 2022;53(1):79–86.
20. Nestler S, Salditt M. Comparing type 1 and type 2 error rates of different tests for heterogeneous treatment effects. *Behav Res Methods.* outubro de 2024;56(7):6582–97.
21. Qin C, Yang S, Chu YH, Zhang H, Pang XW, Chen L, et al. Signaling pathways involved in ischemic stroke: molecular mechanisms and therapeutic interventions. *Signal Transduct Target Ther.* 6 de julho de 2022;7:215.
22. Asmah RH, Sackey P, Adjei P, Archampong TN, Attah S, Doku D, et al. Haematological Indices and Antioxidant Enzyme Activity in Ghanaian Stroke Patients. *BioMed Res Int.* 3 de março de 2022;2022:1203120.
23. Giakoumettis D, Kritis A, Foroglou N. C6 cell line: the gold standard in glioma

- research. *Hippokratia*. 2018;22(3):105–12.
24. Ma Q, Wang C, Wang M, Li Y, Li P, Wang J, et al. Investigation of brain damage mechanism in middle cerebral artery occlusion/reperfusion rats based on i-TRAQ quantitative proteomics. *Exp Brain Res*. abril de 2021;239(4):1247–60.
 25. Rodrigo R, Fernández-Gajardo R, Gutiérrez R, Matamala JM, Carrasco R, Miranda-Merchak A, et al. Oxidative stress and pathophysiology of ischemic stroke: novel therapeutic opportunities. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. agosto de 2013;12(5):698–714.
 26. Bryniarska-Kubiak N, Kubiak A, Trojan E, Wesołowska J, Lekka M, Basta-Kaim A. Oxygen-Glucose Deprivation in Organotypic Hippocampal Cultures Leads to Cytoskeleton Rearrangement and Immune Activation: Link to the Potential Pathomechanism of Ischaemic Stroke. *Cells*. 24 de maio de 2023;12(11):1465.
 27. Wang Y, Cao M, Liu A, Di W, Zhao F, Tian Y, et al. Changes of inflammatory cytokines and neurotrophins emphasized their roles in hypoxic-ischemic brain damage. *Int J Neurosci*. março de 2013;123(3):191–5.
 28. Maddahi A, Edvinsson L. Cerebral ischemia induces microvascular pro-inflammatory cytokine expression via the MEK/ERK pathway. *J Neuroinflammation*. 26 de fevereiro de 2010;7:14.
 29. Montellano FA, Ungethüm K, Ramiro L, Nacu A, Hellwig S, Fluri F, et al. Role of Blood-Based Biomarkers in Ischemic Stroke Prognosis: A Systematic Review. *Stroke*. janeiro de 2021;52(2):543–51.
 30. D’aes T, Marlier Q, Verteneuil S, Quatresooz P, Vandenbosch R, Malgrange B. Re-Evaluating the Relevance of the Oxygen-Glucose Deprivation Model in Ischemic Stroke: The Example of Cdk Inhibition. *Int J Mol Sci*. 10 de abril de 2023;24(8):7009.
 31. Arunadevi R, Jena GB, Sharma SS, Srinivasan K. Modelling Ischemic Stroke by Middle Cerebral Artery Occlusion in Rats. Em: Vijayakumar Sreelatha H, Patel S, Nagarajan P, organizadores. *Animal Models in Research: Principles and Practice* [Internet]. Singapore: Springer Nature; 2024 [citado 21 de novembro de 2024]. p. 449–67. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-981-97-0048-6_16
 32. Mózes T, Baráth I, Gornicsar K, Grosz A, Mózes Ta, Göndöcs Cs, et al. Deviations in Circulating TNF α Levels and TNF α Production by Mononuclear Cells in Healthy Human Populations. *Mediators Inflamm*. 2011;2011:972609.
 33. Rola-Pleszczynski M, Stankova J. Cytokine gene regulation by PGE2, LTB4 and

- PAF. *Mediators Inflamm.* 1992;1(1):5–8.
34. Howell JA, Bidwell GL. Targeting the NF- κ B pathway for therapy of ischemic stroke. *Ther Deliv.* fevereiro de 2020;11(2):113–23.
 35. Wang P, Li C, Liao G, Huang Y, Lv X, Liu X, et al. Vanillin Attenuates Proinflammatory Factors in a tMCAO Mouse Model via Inhibition of TLR4/NF- κ B Signaling Pathway. *Neuroscience.* 21 de maio de 2022;491:65–74.
 36. Shakhnovich V. It's Time to Reverse our Thinking: The Reverse Translation Research Paradigm. *Clin Transl Sci.* março de 2018;11(2):98–9.
 37. Garret FitzGerald *et al.*, The future of humans as model organisms. *Science* 361,552-553(2018).DOI:10.1126/science.aau7779.

ANEXOS

ANEXO 1 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

A presente pesquisa chama-se: Associação de biomarcadores de lesão neural com o comprometimento neurológico pós Acidente Vascular Cerebral Isquêmico (AVCi) agudo. O objetivo principal do estudo é avaliar a relação dos biomarcadores de lesão neuronal com o nível de comprometimento neurológico de pacientes internados por AVCi agudo nas unidades Sistema Único de Saúde (SUS) do Hospital Universitário São Francisco de Paula (HUSFP).

Os participantes do estudo irão passar por uma avaliação onde responderão algumas perguntas e passarão por uma avaliação física e cognitiva através da aplicação da National Institute of Health Stroke Scale, que avalia o comprometimento neurológico através do nível de consciência, movimentos, visão, leitura, força muscular de braços e pernas, sensação, coordenação, fala e etc. Uma amostra sanguínea será coletada para fazer a análise da quantidade de proteínas que indicam lesão neural.

Os riscos são mínimos, e podem apenas gerar leve desconforto por responder questões pessoais, realizar algum movimento solicitado durante a aplicação da escala ou leve hematoma no local da coleta sanguínea. A pesquisa não irá causar mudanças na saúde ou bem estar e caso o participante não queira participar, isso não vai gerar mudança no serviço prestado. Além disso, todos os dados são anônimos e o participante pode desistir da pesquisa a qualquer momento.

Ao participar da pesquisa vai ser possível entender o nível do dano neurológico, qual o prognóstico do paciente, entender se os instrumentos usados possuem resultados precisos e relacionar o nível de comprometimento com diversos aspectos relacionando o diagnóstico clínico, cinético funcional, sensorial cognitivo e sociodemográfico através dos dados coletados.

Pelo presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, declaro que autorizo a minha participação neste projeto de pesquisa, pois fui informado, de forma clara e detalhada, livre de qualquer forma de constrangimento e coerção, dos objetivos, da justificativa, dos procedimentos que serei submetido, dos riscos, desconfortos e benefícios, assim como das alternativas às quais poderia ser submetido, todos acima listados.

Fui, igualmente, informado:

- da garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa;

- da possibilidade do armazenamento do material biológico e informações coletadas para uso como banco de dados em pesquisas futuras;
- da liberdade de retirar meu consentimento, a qualquer momento, e deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuação de meu cuidado e tratamento;
- da garantia de que não serei identificado quando da divulgação dos resultados e que as informações obtidas serão utilizadas apenas para fins científicos vinculados ao presente projeto de pesquisa;
- do compromisso de proporcionar informação atualizada obtida durante o estudo, ainda que esta possa afetar a minha vontade em continuar participando;
- da disponibilidade de tratamento médico e indenização, conforme estabelece a legislação, caso existam danos a minha saúde, diretamente causados por esta pesquisa;
- de que se existirem gastos adicionais, estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

O Pesquisador Responsável por este Projeto de Pesquisa é Isabela Lemes (isabela.lemes@sou.ucpel.edu.br). Recebi claras explicações sobre o estudo, todas registradas neste documento de consentimento. Os investigadores do estudo responderam e responderão, em qualquer etapa do estudo, a todas as minhas perguntas, até a minha completa satisfação. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Católica de Pelotas.

Caso tenha alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da UCPel pelo telefone: (53) 2128 8050 ou através do e-mail cep@ucpel.edu.br, endereço: Rua Gonçalves Chaves, 373 – Sala 411 - Centro, Pelotas - RS, 96015-560, ou com o pesquisador responsável pelo telefone: (51)99820-7137 e e-mail: isabela.lemes@sou.ucpel.edu.br.

O presente documento foi assinado em duas vias de igual teor, ficando uma com o voluntário da pesquisa ou seu representante legal e outra com o pesquisador responsável. Portanto, estou de acordo em autorizar a participação no estudo.

Data ____ / ____ / ____

Nome e assinatura do Paciente ou Voluntário

Nome e assinatura do responsável legal, quando for o caso

DECLARAÇÃO DE RESPONSABILIDADE DO INVESTIGADOR: Expliquei a natureza,

objetivos, riscos e benefícios deste estudo. Coloquei-me à disposição para perguntas e as respondi em sua totalidade. O participante compreendeu minha explicação e aceitou, sem imposições, assinar este consentimento. Tenho como compromisso utilizar os dados e

o material coletado para a publicação de relatórios e artigos científicos referentes a essa pesquisa.

Nome e assinatura do responsável pela obtenção do presente consentimento

Isabela Thirrow Lemes

Nome e assinatura do pesquisador responsável

Universidade Católica de Pelotas
R. Gonçalves Chaves, 373 - Centro, Pelotas - RS, 96015-560, Telefone: (53) 2128-8243

ANEXO 2 - QUESTIONÁRIO DE FILTRAGEM DOS CONTROLES

1. Número de identificação:
2. Encaixa-se nos critérios de inclusão de acordo com as características do pareamento?
☐ Sim
☐ Não
3. Data de nascimento:
4. Possui diagnóstico recente de doença neuro inflamatória ou neurodegenerativa?
☐ Sim
☐ Não
5. Possui histórico recente de lesão cerebral traumática recente?
☐ Sim
☐ Não
6. Sexo
☐ Feminino
☐ Masculino
7. Profissão/ocupação
8. Nível de instrução
☐ Sem instrução
☐ Fundamental incompleto
☐ Fundamental completo
☐ Médio incompleto
☐ Médio completo
☐ Superior incompleto
☐ Superior completo
☐ Pós graduação incompleta
☐ Pós graduação completa
9. Raça
☐ Amarelo(a)
☐ Branco(a)
☐ Indígena
☐ Negro(a)
☐ Pardo(a)
☐ Outro:
10. Estado Civil
☐ Casado(a)
☐ Solteiro(a)
☐ Viúvo(a)
☐ Divorciado(a)
☐ Separado(a)
☐ União estável(a)
11. Renda (em valor aproximado):
12. Há comorbidades associadas?
☐ HAS
☐ DM1
☐ DM2
☐ Cardiopatia
☐ Nefropatia
☐ Outro:
13. Tabagismo
☐ Não tabagista
☐ Tabagista
☐ Ex tabagista
14. Se a resposta anterior foi “tabagista”, qual a dose?
15. Se a resposta anterior foi “ex tabagista”, há quanto tempo parou?
16. Alcoolismo
☐ Faz uso de bebidas alcoólicas
☐ Não faz uso de bebidas alcoólicas
17. Se a resposta anterior foi “faz uso de bebidas alcoólicas”, qual a dose?
18. Avaliador:
19. Coletador de sangue:
20. Coleta bem sucedida?
☐ Sim
☐ Não

ANEXO 3 - QUESTIONÁRIO DE CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

1. Número de identificação
2. Sexo
 - ☐ Feminino
 - ☐ Masculino
3. Data de nascimento
4. Profissão/ocupação
5. Nível de instrução
 - ☐ Sem instrução
 - ☐ Fundamental incompleto
 - ☐ Fundamental completo
 - ☐ Médio incompleto
 - ☐ Médio completo
 - ☐ Superior incompleto
 - ☐ Superior completo
 - ☐ Pós graduação incompleta
 - ☐ Pós graduação completa
6. Se a resposta anterior foi “outros”, justifique.
7. Data de Internação
8. Tipo de AVC
 - ☐ AVCi
 - ☐ AVCh
 - ☐ AIT
9. Avaliador
10. Data de avaliação
11. Cidade de residência do paciente
12. Capacidade de compreensão segundo o prontuário
 - ☐ Lúcido (a)/orientado (a)
 - ☐ Desorientado (a)
 - ☐ Confuso (a)
 - ☐ Oscilante
 - ☐ Outro:
13. Comprometimento neurológico prévio
 - ☐ Sim
 - ☐ Não
 - ☐ Outro:
14. AVC Prévio com ou sem sequelas?
 - ☐ Sim (AVCh)
 - ☐ Sim (AVCi)
 - ☐ Não
 - ☐ Outro:
15. Se a resposta anterior foi “sim”, há quanto tempo e quais sequelas?
16. Comprometimento motor prévio?
 - ☐ Sim
 - ☐ Não
17. Se a resposta anterior foi “sim”, qual?
18. Raça
 - ☐ Amarelo(a)
 - ☐ Branco(a)
 - ☐ Indígena
 - ☐ Negro(a)
 - ☐ Pardo(a)
 - ☐ Outro:
19. Estado Civil
 - ☐ Casado(a)
 - ☐ Solteiro(a)
 - ☐ Viúvo(a)
 - ☐ Divorciado(a)
 - ☐ Separado(a)
 - ☐ União estável(a)
20. Renda (em valor aproximado)

21. Há comorbidades associadas?

- ☐ HAS
- ☐ DM1
- ☐ DM2
- ☐ Cardiopatia
- ☐ Nefropatia
- ☐ Outro:

22. Tabagismo

- ☐ Não tabagista
- ☐ Tabagista
- ☐ Ex tabagista

23. Se a resposta anterior foi “tabagista”, qual a dose?

24. Se a resposta anterior foi “ex tabagista”, há quanto tempo parou?

25. Alcoolismo

- ☐ Faz uso de bebidas alcoólicas

- ☐ Não faz uso de bebidas alcoólicas

26. Se a resposta anterior foi “faz uso de bebidas alcoólicas”, qual a dose?

27. Proveniente de:

- ☐ Internação por outro motivo
- ☐ PSP
- ☐ UTI

28. Fez fisioterapia na internação

29. Foi possível coletar amostra sanguínea?

30. Demais observações que se façam necessárias sobre o caso:

31. Paciente encaixa-se nos critérios de inclusão e exclusão e assinou o TCLE?

- ☐ Sim
- ☐ Não

ANEXO 4- CLASSIFICAÇÃO SOCIOECONÔMICA | ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS EMPRESAS DE PESQUISA

SISTEMA DE PONTOS

Variáveis

			Quantidade			
	0	1	2	3	4 ou +	
Banheiros	0	3	7	10	14	
Empregados domésticos	0	3	7	10	13	
Automóveis	0	3	5	8	11	
Microcomputador	0	3	6	8	11	
Lava louca	0	3	6	6	6	
Geladeira	0	2	3	5	5	
Freezer	0	2	4	6	6	
Lava roupa	0	2	4	6	6	
DVD	0	1	3	4	6	
Micro-ondas	0	2	4	4	4	
Motocicleta	0	1	3	3	3	
Secadora roupa	0	2	2	2	2	

Grau de instrução do chefe de família e acesso a serviços públicos

Grau de instrução do chefe da família		
Analfabeto / Fundamental I incompleto		0
Fundamental I completo / Fundamental II incompleto		1
Fundamental II completo / Médio incompleto		2
Médio completo / Superior incompleto		4
Superior completo		7
Serviços públicos		
	Não	Sim
Água encanada	0	4
Rua pavimentada	0	2

Cortes do Critério Brasil

Classe	Pontos
1 – A	45 – 100
2 - B1	38 – 44
3 - B2	29 – 37
4 - C1	23 - 28
5 - C2	17 – 22
6 - DE	0 – 16

PROCEDIMENTO NA COLETA DOS ITENS

Modelo de Questionário sugerido para aplicação

INSTRUÇÃO: Todos os itens devem ser perguntados pelo entrevistador e respondidos pelo entrevistado.

Vamos começar? No domicílio tem _____ (LEIA CADA ITEM)

ITENS DE CONFORTO	NÃO POSSUI	QUANTIDADE QUE POSSUI			
		1	2	3	4+
Quantidade de automóveis de passeio exclusivamente para uso particular					
Quantidade de empregados mensalistas, considerando apenas os que trabalham pelo menos cinco dias por semana					
Quantidade de máquinas de lavar roupa, excluindo tanquinho					
Quantidade de banheiros					
DVD, incluindo qualquer dispositivo que leia DVD e desconsiderando DVD de automóvel					
Quantidade de geladeiras					
Quantidade de <i>freezers</i> independentes ou parte da geladeira duplex					
Quantidade de microcomputadores, considerando computadores de mesa, laptops, notebooks e netbooks e desconsiderando tablets, palms ou smartphones					
Quantidade de lavadora de louças					
Quantidade de fornos de micro-ondas					
Quantidade de motocicletas, desconsiderando as usadas exclusivamente para uso profissional					
Quantidade de máquinas secadoras de roupas, considerando lava e seca					

A água utilizada neste domicílio é proveniente de?	
1	Rede geral de distribuição
2	Poço ou nascente
3	Outro meio

Considerando o trecho da rua do seu domicílio, você diria que a rua é:	
1	Asfaltada/Pavimentada
2	Terra/Cascalho

Qual é o grau de instrução do chefe da família? Considere como chefe da família a pessoa que contribui com a maior parte da renda do domicílio.

Nomenclatura atual	Nomenclatura anterior
Analfabeto / Fundamental I incompleto	Analfabeto/Primário Incompleto
Fundamental I completo / Fundamental II Incompleto	Primário Completo/Ginásio Incompleto
Fundamental completo/Médio Incompleto	Ginásio Completo/Colegial Incompleto
Médio completo/Superior incompleto	Colegial Completo/Superior Incompleto
Superior completo	Superior Completo

ANEXO 5 - CLASSIFICAÇÃO DE DEPENDÊNCIA EM DROGAS (ASSIST)

Nome: _____ Registro: _____

Entrevistador: _____ DATA: ____/____/____

ASSIST - OMS

1. Na sua vida qual(is) dessa(s) substâncias você já usou? (somente uso não prescrito pelo médico)	NÃO	SIM
a. derivados do tabaco	0	3
b. bebidas alcoólicas	0	3
c. maconha	0	3
d. cocaína, crack	0	3
e. anfetaminas ou êxtase	0	3
f. inalantes	0	3
g. hipnóticos/sedativos	0	3
h. alucinógenos	0	3
i. opióides	0	3
j. outras, especificar	0	3

- Se "NÃO" em todos os itens investigue: Nem mesmo quando estava na escola?
- Se "NÃO" em todos os itens, pare a entrevista
- Se "SIM" para alguma droga, continue com as demais questões

QUESTIONÁRIO PARA TRIAGEM DO USO DE ÁLCOOL, TABACO E OUTRAS SUBSTÂNCIAS.

2. Durante os três últimos meses, com que frequência você utilizou essa(s) substância(s) que mencionou? (primeira droga, depois a segunda droga, etc)	NUNCA	1 OU 2 VEZES	MENSALMENTE	SEM ANUALMENTE	DIARIAMENTE OU QUASE TODOS OS DIAS
a. derivados do tabaco	0	2	3	4	6
b. bebidas alcoólicas	0	2	3	4	6
c. maconha	0	2	3	4	6
d. cocaína, crack	0	2	3	4	6
e. anfetaminas ou êxtase	0	2	3	4	6
f. inalantes	0	2	3	4	6
g. hipnóticos/sedativos	0	2	3	4	6
h. alucinógenos	0	2	3	4	6
i. opióides	0	2	3	4	6
j. outras, especificar	0	2	3	4	6

- Se "NUNCA" em todos os itens da questão 2 pule para a questão 6, com outras respostas continue com as demais questões

3. Durante os três últimos meses, com que frequência você teve um forte desejo ou urgência em consumir? (primeira droga, segunda droga, etc)	NUNCA	1 OU 2 VEZES	MENSALMENTE	SEM ANUALMENTE	DIARIAMENTE OU QUASE TODOS OS DIAS
a. derivados do tabaco	0	3	4	5	6
b. bebidas alcoólicas	0	3	4	5	6
c. maconha	0	3	4	5	6
d. cocaína, crack	0	3	4	5	6
e. anfetaminas ou êxtase	0	3	4	5	6
f. inalantes	0	3	4	5	6
g. hipnóticos/sedativos	0	3	4	5	6
h. alucinógenos	0	3	4	5	6
i. opióides	0	3	4	5	6
j. outras, especificar	0	3	4	5	6

4. Durante os três últimos meses, com que frequência o seu consumo de (primeira droga, depois a segunda droga, etc) resultou em problema de saúde, social, legal ou financeiro?	NUNCA	1 OU 2 VEZES	MENSALMENTE	SEM ANUALMENTE	DIARIAMENTE OU QUASE TODOS OS DIAS
a. derivados do tabaco	0	4	5	6	7
b. bebidas alcoólicas	0	4	5	6	7
c. maconha	0	4	5	6	7
d. cocaína, crack	0	4	5	6	7
e. anfetaminas ou êxtase	0	4	5	6	7
f. inalantes	0	4	5	6	7
g. hipnóticos/sedativos	0	4	5	6	7
h. alucinógenos	0	4	5	6	7
i. opióides	0	4	5	6	7
j. outras, especificar	0	4	5	6	7

NOMES POPULARES OU COMERCIAIS DAS DROGAS

a. produtos do tabaco (cigarro, charuto, cachimbo, fumo de corda)
b. bebidas alcólicas (cerveja, vinho, champagne, licor, pinga uísque, vodca, vermouths, caninha, rum tequila, gin)
c. maconha (baseado, erva, liamba, diamba, birra, fuminho, fumo, mato, bagulho, pango, manga-rosa, massa, haxixe, skank, etc)
d. cocaína, crack (coca, pó, branquinha, nuvem, farinha, neve, pedra, caximbo, brilho)
e. estimulantes como anfetaminas (bolinhas, rebites, bifetamina, moderine, MDMA)
f. inalantes (solventes, cola de sapateiro, tinta, esmalte, corretivo, verniz, tinner, clorofórmio, tolueno, gasolina, éter, lança perfume, cheirinho da lolô)
g. hipnóticos, sedativos (ansiolíticos, tranquilizantes, barbitúricos, fenobarbital, pentobarbital, benzodiazepínicos, diazepam)
h. alucinógenos (LSD, chá-de-lírio, ácido, passaporte, mescalina, peiote, cacto)
i. opiáceos (morfina, codeína, ópio, heroína elixir, metadona)
j. outras – especificar:

5. Durante os três últimos meses, com que frequência, por causa do seu uso de (primeira droga, depois a segunda droga, etc) , você deixou de fazer coisas que eram normalmente esperadas de você?	NUNCA	1 OU 2 VEZES	MENSALMENTE	SEMANALMENTE	DIARIAMENTE OU QUASE TODOS OS DIAS
a. derivados do tabaco	0	5	6	7	8
b. bebidas alcoólicas	0	5	6	7	8
c. maconha	0	5	6	7	8
d. cocaína, crack	0	5	6	7	8
e. anfetaminas ou êxtase	0	5	6	7	8
f. inalantes	0	5	6	7	8
g. hipnóticos/sedativos	0	5	6	7	8
h. alucinógenos	0	5	6	7	8
i. opióides	0	5	6	7	8
j. outras, especificar	0	5	6	7	8

7. Alguma vez você já tentou controlar, diminuir ou parar o uso de ((primeira droga, depois a segunda droga, etc...)) e não conseguiu?	NÃO, Nunca	SIM, nos últimos 3 meses	SIM, mas não nos últimos 3 meses
a. derivados do tabaco	0	6	3
b. bebidas alcoólicas	0	6	3
c. maconha	0	6	3
d. cocaína, crack	0	6	3
e. anfetaminas ou êxtase	0	6	3
f. inalantes	0	6	3
g. hipnóticos/sedativos	0	6	3
h. alucinógenos	0	6	3
i. opióides	0	6	3
j. outras, especificar	0	6	3

- **FAÇA as questões 6 e 7 para todas as substâncias mencionadas na questão 1**

6. Há amigos, parentes ou outra pessoa que tenha demonstrado preocupação com seu uso de (primeira droga, depois a segunda droga, etc...) ?	NÃO, Nunca	SIM, nos últimos 3 meses	SIM, mas não nos últimos 3 meses
a. derivados do tabaco	0	6	3
b. bebidas alcoólicas	0	6	3
c. maconha	0	6	3
d. cocaína, crack	0	6	3
e. anfetaminas ou êxtase	0	6	3
f. inalantes	0	6	3
g. hipnóticos/sedativos	0	6	3
h. alucinógenos	0	6	3
i. opióides	0	6	3
j. outras, especificar	0	6	3

Nota Importante: Pacientes que tenham usado drogas injetáveis nos últimos 3 meses devem ser perguntados sobre seu padrão de uso injetável durante este período, para determinar seus níveis de risco e a melhor forma de intervenção.

8- Alguma vez você já usou drogas por injeção? (Apenas uso não médico)

NÃO, nunca	SIM, nos últimos 3 meses	SIM, mas não nos últimos 3 meses
------------	--------------------------	----------------------------------

Guia de Intervenção para Padrão de uso injetável

Uma vez por semana ou menos
Ou menos de três dias seguidos → Intervenção Breve incluindo cartão de "riscos associados com o uso injetável"

Mais do que uma vez por semana
Ou mais do que três dias seguidos → Intervenção mais aprofundada e tratamento intensivo*

PONTUAÇÃO PARA CADA DROGA

	Anote a pontuação para cada droga. SOME SOMENTE das Questões 2, 3, 4, 5, 6 e 7	Nenhuma intervenção	Receber Intervenção Breve	Encaminhar para tratamento mais intensivo
Tabaco		0-3	4-26	27 ou mais
Alcool		0-10	11-26	27 ou mais
Maconha		0-3	4-26	27 ou mais
Cocaína		0-3	4-26	27 ou mais
Anfetaminas		0-3	4-26	27 ou mais
Inalantes		0-3	4-26	27 ou mais
Hipnóticos/sedativos		0-3	4-26	27 ou mais
Alucinógenos		0-3	4-26	27 ou mais
Opióides		0-3	4-26	27 ou mais

Cálculo do escore de envolvimento com uma substância específica.

Para cada substância (de 'a' a 'j') some os escores obtidos nas questões 2 a 7 (Inclusive).

Não inclua os resultados das questões 1 e 8 aqui.

Por exemplo, um escore para maconha deverá ser calculado do seguinte modo: Q2c + Q3c + Q4c + Q5c + Q6c + Q7c.

Note que Q5 para tabaco não é codificada, sendo a pontuação para tabaco = Q2a + Q3a + Q4a + Q6a + Q7a

ANEXO 6 - NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH STROKE SCALE (NIHSS)

Identificação do Paciente

N I H
STROKE
SCALE

Nome: _____

Registro: _____

Exame inicial: _____ Data ____/____/____

Instrução	Definição da escala	Escore
1a. Nível de Consciência O investigador deve escolher uma resposta mesmo se uma avaliação completa é prejudicada por obstáculos como um tubo orotraqueal, barreiras de linguagem, trauma ou curativo orotraqueal. Um 3 é dado apenas se o paciente não faz nenhum movimento (outro além de postura reflexa) em resposta à estimulação dolorosa.	0 = Alerta; responde com entusiasmo. 1 = Não alerta, mas ao ser acordado por mínima estimulação obedece, responde ou reage. 2 = Não alerta, requer repetida estimulação ou estimulação dolorosa para realizar movimentos (não estereotipados). 3 = Responde somente com reflexo motor ou reações autonômicas, ou totalmente irresponsivo, flácido e arreflexo.	▼
1b. Perguntas de Nível de Consciência O paciente é questionado sobre o mês e sua idade. A resposta deve ser correta - não há nota parcial por chegar perto. Pacientes com afasia ou esturpor que não compreendem as perguntas irão receber 2. Pacientes incapacitados de falar devido a intubação orotraqueal, trauma orotraqueal, disartria grave de qualquer causa, barreiras de linguagem ou qualquer outro problema não secundário a afasia receberão um 1. É importante que somente a resposta inicial seja considerada e que o examinador não "ajude" o paciente com dicas verbais ou não verbais.	0 = Responde ambas as questões corretamente. 1 = Responde uma questão corretamente. 2 = Não responde nenhuma questão corretamente.	
1c. Comandos de Nível de Consciência O paciente é solicitado a abrir e fechar os olhos e então abrir e fechar a mão não parética. Substitua por outro comando de um único passo se as mãos não podem ser utilizadas. É dado crédito se uma tentativa inequívoca é feita, mas não completada devido à fraqueza. Se o paciente não responde ao comando, a tarefa deve ser demonstrada a ele (pantomima) e o resultado registrado (i.e., segue um, nenhum ou ambos os comandos). Aos pacientes com trauma, amputação ou outro impedimento físico devem ser dados comandos únicos compatíveis. Somente a primeira tentativa é registrada.	0 = Realiza ambas as tarefas corretamente. 1 = Realiza uma tarefa corretamente. 2 = Não realiza nenhuma tarefa corretamente.	

2. Melhor olhar conjugado Somente os movimentos oculares horizontais são testados. Movimentos oculares voluntários ou reflexos (óculo-cefálico) recebem nota, mas a prova calórica não é usada. Se o paciente tem um desvio conjugado do olhar, que pode ser sobreposto por atividade voluntária ou reflexa, o escore será 1. Se o paciente tem uma paresia de nervo periférica isolada (NC III, IV ou VI), marque 1. O olhar é testado em todos os pacientes afásicos. Os pacientes com trauma ocular, curativos, cegueira preexistente ou outro distúrbio de acuidade ou campo visual devem ser testados com movimentos reflexos e a escolha feita pelo investigador. Estabelecer contato visual e, então, mover-se perto do paciente de um lado para outro, pode esclarecer a presença de paralisia do olhar.	0 = Normal. 1 = Paralisia parcial do olhar. Este escore é dado quando o olhar é anormal em um ou ambos os olhos, mas não há desvio forçado ou paresia total do olhar. 2 = Desvio forçado ou paralisia total do olhar que não podem ser vencidos pela manobra óculo-cefálica.	
---	--	--

Instrução	Definição da escala	Escore
3. Visual OS campos visuais (quadrantes superiores e inferiores) são testados por confrontação, utilizando contagem de dedos ou ameaça visual, conforme apropriado. O paciente deve ser encorajado, mas se olha para o lado do movimento dos dedos, deve ser considerado como normal. Se houver cegueira unilateral ou enucleação, os campos visuais no olho restante são avaliados. Marque 1 somente se uma clara assimetria, incluindo quadrantanopsia, for encontrada. Se o paciente é cego por qualquer causa, marque 3. Estimulação dupla simultânea é realizada neste momento. Se houver uma extinção, o paciente recebe 1 e os resultados são usados para responder a questão 11.	0 = Sem perda visual. 1 = Hemianopsia parcial. 2 = Hemianopsia completa. 3 = Hemianopsia bilateral (cego, incluindo cegueira cortical).	
4. Paralisia Facial Pergunte ou use pantomima para encorajar o paciente a mostrar os dentes ou sorrir e fechar os olhos. Considere a simetria de contração facial em resposta a estímulo doloroso em paciente pouco responsivo ou incapaz de compreender. Na presença de trauma /curativo facial, tubo orotraqueal, esparadrapo ou outra barreira física que obscureça a face, estes devem ser removidos, tanto quanto possível.	0 = Movimentos normais simétricos. 1 = Paralisia facial leve (apagamento de prega nasolabial, assimetria no sorriso). 2 = Paralisia facial central evidente (paralisia facial total ou quase total da região inferior da face). 3 = Paralisia facial completa (ausência de movimentos faciais das regiões superior e inferior da face).	
5. Motor para braços O braço é colocado na posição apropriada: extensão dos braços (palmas para baixo) a 90° (se sentado) ou a 45° (se deitado). É valorizada queda do braço se esta ocorre antes de 10 segundos. O paciente afásico é encorajado através de firmeza na voz e de pantomima, mas não com estimulação dolorosa. Cada membro é testado isoladamente, iniciando pelo braço não-parético. Somente em caso de amputação ou de fusão de articulação no ombro, o item deve ser considerado não-testável (NT), e uma explicação deve ser escrita para esta escolha.	0 = Sem queda; mantém o braço 90° (ou 45°) por 10 segundos completos. 1 = Queda; mantém o braço a 90° (ou 45°), porém este apresenta queda antes dos 10 segundos completos; não toca a cama ou outro suporte. 2 = Algum esforço contra a gravidade; o braço não atinge ou não mantém 90° (ou 45°), cai na cama, mas tem alguma força contra a gravidade. 3 = Nenhum esforço contra a gravidade; braço despenca. 4 = Nenhum movimento. NT = Amputação ou fusão articular, explique: _____ 5a. Braço esquerdo 5b. Braço direito	
6. Motor para pernas A perna é colocada na posição apropriada: extensão a 30° (sempre na posição supina). É valorizada queda do braço se esta ocorre antes de 5 segundos. O paciente afásico é encorajado através de firmeza na voz e de pantomima, mas não com estimulação dolorosa. Cada membro é testado isoladamente, iniciando pela perna não-parética. Somente em caso de amputação ou de fusão de articulação no quadril, o item deve ser considerado não-testável (NT), e uma explicação deve ser escrita para esta escolha.	0 = Sem queda; mantém a perna a 30° por 5 segundos completos. 1 = Queda; mantém a perna a 30°, porém esta apresenta queda antes dos 5 segundos completos; não toca a cama ou outro suporte. 2 = Algum esforço contra a gravidade; a perna não atinge ou não mantém 30°, cai na cama, mas tem alguma força contra a gravidade. 3 = Nenhum esforço contra a gravidade; perna despenca. 4 = Nenhum movimento. NT = Amputação ou fusão articular, explique: _____ 6a. Perna esquerda 6b. Perna direita	

Instrução	Definição da escala	Escore
7. Ataxia de membros Este item é avaliado se existe evidência de uma lesão cerebelar unilateral. Teste com os olhos abertos. Em caso de defeito visual, assegure-se que o teste é feito no campo visual intacto. Os testes índice-nariz e calcanhar-jelho são realizados em ambos os lados e a ataxia é valorizada, somente, se for desproporcional à fraqueza. A ataxia é considerada ausente no paciente que não pode entender ou está hemiplégico. Somente em caso de amputação ou de fusão de articulações, o item deve ser considerado não-testável (NT), e uma explicação deve ser escrita para esta escolha. Em caso de cegueira, teste tocando o nariz, a partir de uma posição com os braços estendidos.	0 = Ausente. 1 = Presente em 1 membro. 2 = Presente em dois membros. NT = Amputação ou fusão articular, explique: _____	
8. Sensibilidade Avalie sensibilidade ou mímica facial ao beliscar ou retirada do estímulo doloroso em paciente torporoso ou afásico. Somente a perda de sensibilidade atribuída ao AVC é registrada como anormal e o examinador deve testar tantas áreas do corpo (braços [exceto mãos], pernas, tronco e face) quantas forem necessárias para checar acuradamente uma perda hemisensitiva. Um escore de 2, "grave ou total" deve ser dado somente quando uma perda grave ou total da sensibilidade pode ser claramente demonstrada. Portanto, pacientes em estupor e afásicos irão receber provavelmente 1 ou 0. O paciente com AVC de tronco que tem perda de sensibilidade bilateral recebe 2. Se o paciente não responde e está quadriplégico, marque 2. Pacientes em coma (item 1a=3) recebem arbitrariamente 2 neste item.	0 = Normal; nenhuma perda. 1 = Perda sensitiva leve a moderada; a sensibilidade ao beliscar é menos aguda ou diminuída do lado afetado, ou há uma perda da dor superficial ao beliscar, mas o paciente está ciente de que está sendo tocado. 2 = Perda da sensibilidade grave ou total; o paciente não sente que está sendo tocado.	
9. Melhor linguagem Uma grande quantidade de informações acerca da compreensão pode obtida durante a aplicação dos itens precedentes do exame. O paciente é solicitado a descrever o que está acontecendo no quadro em anexo, a nomear os itens na lista de identificação anexa e a ler da lista de sentença anexa. A compreensão é julgada a partir destas respostas assim como das de todos os comandos no exame neurológico geral precedente. Se a perda visual interfere com os testes, peça ao paciente que identifique objetos colocados em sua mão, repita e produza falas. O paciente intubado deve ser incentivado a escrever. O paciente em coma (Item 1A=3) receberá automaticamente 3 neste item. O examinador deve escolher um escore para pacientes em estupor ou pouco cooperativos, mas a pontuação 3 deve ser reservada ao paciente que está mudo e que não segue nenhum comando simples.	0 = Sem afasia; normal. 1 = Afasia leve a moderada; alguma perda óbvia da fluência ou dificuldade de compreensão, sem limitação significativa das idéias expressão ou forma de expressão. A redução do discurso e/ou compreensão, entretanto, dificultam ou impossibilitam a conversação sobre o material fornecido. Por exemplo, na conversa sobre o material fornecido, o examinador pode identificar figuras ou item da lista de nomeação a partir da resposta do paciente. 2 = Afasia grave; toda a comunicação é feita através de expressões fragmentadas; grande necessidade de interferência, questionamento e adivinhação por parte do ouvinte. A quantidade de informação que pode ser trocada é limitada; o ouvinte carrega o fardo da comunicação. O examinador não consegue identificar itens do material fornecido a partir da resposta do paciente. 3 = Mudo, afasia global; nenhuma fala útil ou compreensão auditiva.	

Instrução	Definição da escala	Escore
10. Disartria Se acredita que o paciente é normal, uma avaliação mais adequada é obtida, pedindo-se ao paciente que leia ou repita palavras da lista anexa. Se o paciente tem afasia grave, a clareza da articulação da fala espontânea pode ser graduada. Somente se o paciente estiver intubado ou tiver outras barreiras físicas a produção da fala, este item deverá ser considerado não testável (NT). Não diga ao paciente por que ele está sendo testado.	0 = Normal. 1 = Disartria leve a moderada; paciente arrasta pelo menos algumas palavras, e na pior das hipóteses, pode ser entendido, com alguma dificuldade. 2 = Disartria grave; fala do paciente é tão empastada que chega a ser ininteligível, na ausência de disfasia ou com disfasia desproporcional, ou é mudo/anártrico. NT = Intubado ou outra barreira física; explique	
11. Extinção ou Desatenção (antiga negligência) Informação suficiente para a identificação de negligência pode ter sido obtida durante os testes anteriores. Se o paciente tem perda visual grave, que impede o teste da estimulação visual dupla simultânea, e os estímulos cutâneos são normais, o escore é normal. Se o paciente tem afasia, mas parece atentar para ambos os lados, o escore é normal. A presença de negligência espacial visual ou anosagnosia pode também ser considerada como evidência de negligência. Como a anormalidade só é pontuada se presente, o item nunca é considerado não testável.	0 = Nenhuma anormalidade. 1 = Desatenção visual, tátil, auditiva, espacial ou pessoal, ou extinção à estimulação simultânea em uma das modalidades sensoriais. 2 = Profunda hemi-desatenção ou hemi-desatenção para mais de uma modalidade; não reconhece a própria mão e se orienta somente para um lado do espaço.	

Você sabe como fazer.

De volta pra casa.

Eu cheguei em casa do trabalho.

Próximo da mesa, na sala de jantar.

Eles ouviram o Pelé falar no rádio.

Mamãe

Tic-Tac

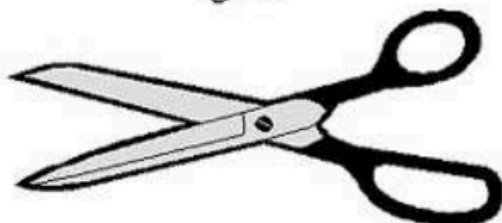
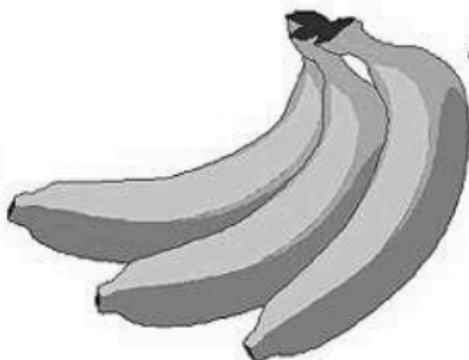
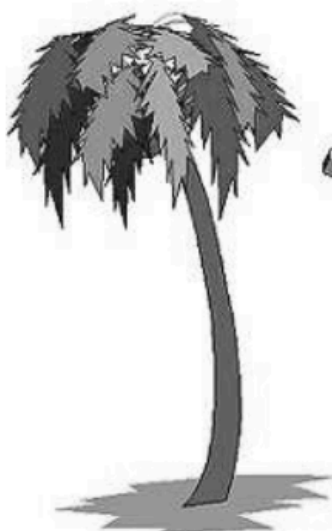
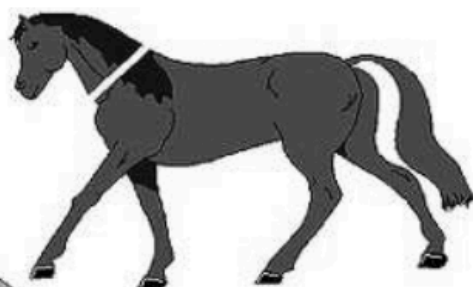
Paralelo

Obrigado

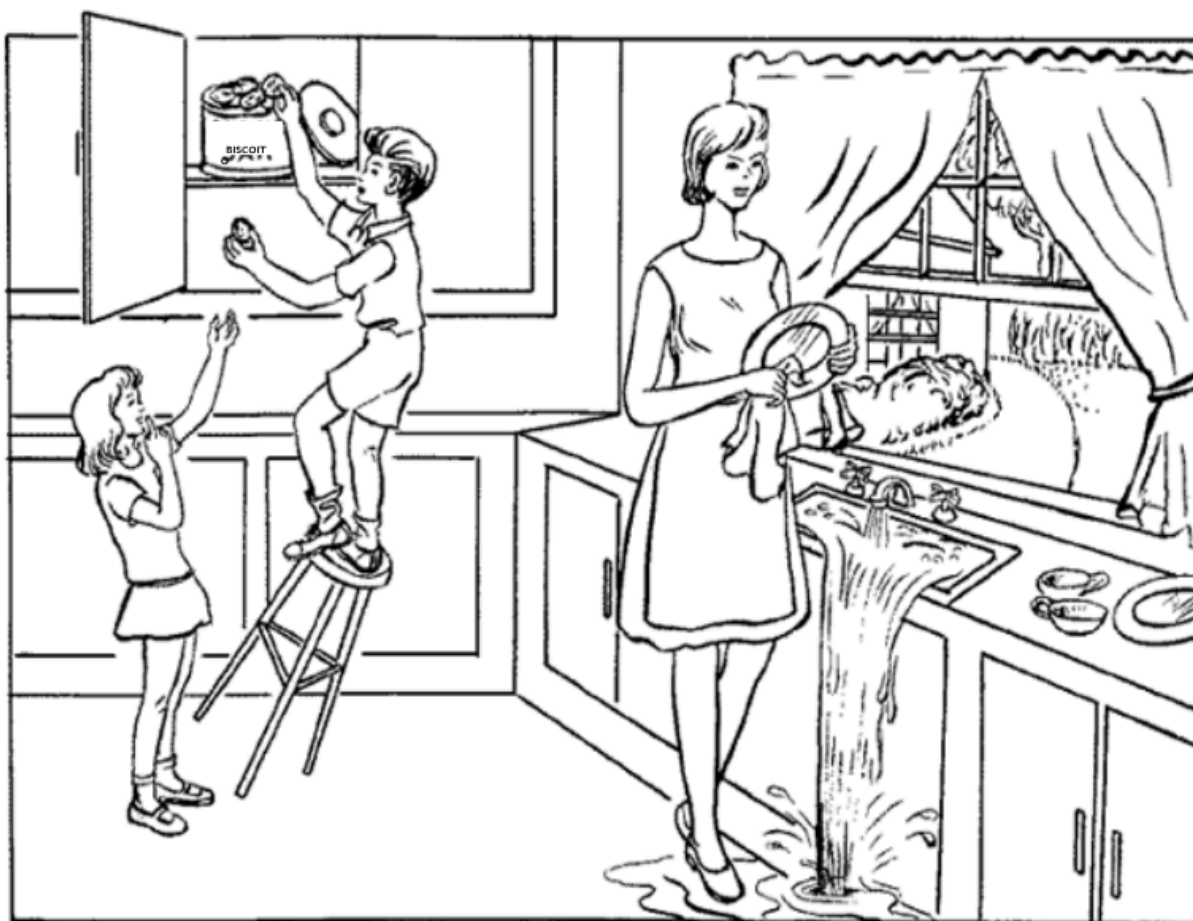
Estrada de ferro

Jogador de futebol

Lista para item 10. Disatria



Lista para nomeação no item 9. Melhor linguagem



Copyright © 1983 by Lee & Fetisov

Figura para o item 9. Melhor linguagem

ANEXO 7 - TERMO DE COMPROMISSO PARA UTILIZAÇÃO DE DADOS DE PRONTUÁRIOS MÉDICOS



UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PELOTAS PRÓ-REITORIA ACADÊMICA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP/UCPel

TERMO DE COMPROMISSO PARA UTILIZAÇÃO DE DADOS DE PRONTUÁRIOS MÉDICOS

Os pesquisadores abaixo assinados, responsáveis e colaboradores do Projeto de pesquisa intitulado: c comprometem-se a garantir e preservar as informações dos prontuários e base de dados do Hospital Universitário São Francisco de Paula garantindo a plena confidencialidade dos mesmos e identidade dos pacientes.

Concordam, igualmente, que as informações coletadas serão utilizadas única e exclusivamente para execução do projeto acima descrito. As informações somente poderão ser divulgadas de forma anônima.

Pelotas, RS, 31 de agosto de 2023.

Nome do Pesquisador	Assinatura
Adriano Martimbianco de Assis	
Isabela Thurow Lemes	
Aline Longoni dos Santos	
Júlia de Castro Menchaca	
Fabiana da Silveira Santos Sinnott	
Luana Born Pureza	

Concordância do Responsável pelo Serviço de Arquivo
Médico

ANEXO 8 - TERMO DE COMPROMISSO PARA UTILIZAÇÃO DE BANCO DE DADOS



UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PELOTAS
PRÓ-REITORIA ACADÊMICA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP/UCPel

TERMO DE COMPROMISSO PARA UTILIZAÇÃO DE BANCO DE DADOS

Os pesquisadores abaixo assinados, responsáveis e colaboradores do Projeto de pesquisa intitulado: Associação de biomarcadores de lesão neural com o comprometimento neurológico de pacientes pós Acidente Vascular Cerebral Isquêmico (AVCi) agudo comprometem-se a garantir e preservar as informações do banco de dados do Hospital Universitário São Francisco de Paula garantindo a plena confidencialidade dos mesmos e identidade dos pacientes.

Concordam, igualmente, que as informações coletadas serão utilizadas única e exclusivamente para execução do projeto acima descrito. As informações somente poderão ser divulgadas de forma anônima.

Pelotas, RS, 31 de agosto de 2023.

Nome do Pesquisador	Assinatura
Adriano Martimbianco de Assis	<i>Adriano M. de Assis</i>
Isabela Thurow Lemes	<i>Isabela Thurow Lemes</i>
Aline Longoni dos Santos	<i>Aline Longoni dos Santos</i>
Júlia de Castro Menchaca	<i>Júlia C. Menchaca</i>
Fabiana da Silveira Santos Sinnott	<i>Fabiana da Silveira Santos Sinnott</i>
Luana Born Pureza	<i>Luana Born Pureza</i>

Concordância do Responsável pelo Banco de Dados

ANEXO 9 - TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA REALIZAÇÃO DE PESQUISA



**São Francisco
de Paula**
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO



**UNIVERSIDADE
CATÓLICA
DE PELOTAS**

TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA REALIZAÇÃO DE PESQUISA

Ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Católica de Pelotas,

Declaro ter conhecimento e autorizo a realização da pesquisa intitulada "Associação de biomarcadores de lesão neural com o comprometimento neurológico de pacientes pós Acidente Vascular Cerebral Isquêmico (AVCi) agudo" O referido projeto será desenvolvido no(a) Hospital Universitário São Francisco de Paula e somente poderá ocorrer a partir da apresentação da carta de aprovação do CEP e da entrega da documentação obrigatória disposta em norma institucional.

Pelotas, 08 de agosto de 2023.

Atenciosamente,

Dra. Márcia Andersson
CREMERS 17087
Diretora Técnica - HUSFP

Dra. Marcia Christina Stark Andersson
Direção Técnica do HUSFP

Márcio Slaviero
Direção Geral
HUSFP

Márcio Rafael Slaviero
Direção Geral do HUSFP

Emily de Lima Lara

Emily de Lima Lara
Comitê de Educação/ NIEPAS HUSFP

Adriano M. de Aguiar
Isabela Thoral Lopes
Kerolayne dos Santos
Julia C. Faria
Luanne Boon Pereira

Raquel Norma Norberg
Coord. Administrativa
HUSFP

NIEPAS
HUSFP

ANEXO 10 - TERMO DE COMPROMISSO PARA UTILIZAÇÃO DE DADOS COLETADOS



**São Francisco
de Paula**
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO



TERMO DE COMPROMISSO DE CONFIDENCIALIDADE DE DADOS COLETADOS

A/C

Núcleo de Ensino e Pesquisa - NIEPAS

Eu, Isabela Thurow Lemes, vinculado (a) ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Comportamento, comprometo-me a acessar o(s) dado(s) : dos prontuários médicos dos pacientes

_____ previamente autorizados pela Direção Técnica, como fonte de informação preliminar ao desenvolvimento de minha pesquisa intitulada "Associação de biomarcadores de lesão neural com o comprometimento neurológico de pacientes pós Acidente Vascular Cerebral Isquêmico (AVCi), com orientação do Professor (a) Adriano Martimbianco de Assis.

Diante disso, comprometo-me a garantir a confidencialidade do(s) referidos(s) dados, sob pena da não continuidade da referida pesquisa.

Também, comprometo-me que, concomitantemente ao processo de autorização pelo Comitê de Ética, esta pesquisa passará pelos tramites institucionais, sendo submetida ao Fluxo de Solicitação para realização de pesquisa acadêmica.

Sem mais,

Isabela Lemes

Pelotas, 20 de julho de 2023.

Nome e Assinatura do Solicitante

CAMPO DESTINADO À ANÁLISE E PARECER DA DIREÇÃO TÉCNICA

PARECER FINAL () DEFERIDO () NÃO DEFERIDO Data: ____/____/____	Dra. Márcia Andersson CREMERS 17087 Diretora Técnica - HUSFP
Carimbo/assinatura da Direção Técnica	

ANEXO 11 - PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



UNIVERSIDADE CATÓLICA DE
PELOTAS - UCPEL



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Associação de biomarcadores de lesão neural com o comprometimento neurológico em pacientes pós Acidente Vascular Cerebral isquêmico (AVCi) agudo

Pesquisador: ISABELA THUROW LEMES

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 72947823.2.0000.5339

Instituição Proponente: Universidade Católica de Pelotas - UCPEL

Patrocinador Principal: MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 6.433.569

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um adendo ao projeto de pesquisa referente a dissertação de mestrado, onde foi solicitado a inclusão dos instrumentos ABEP, para avaliação socioeconômica, e ASSIST, para avaliação do consumo de drogas.

Objetivo da Pesquisa:

Os pesquisadores não apresentaram novos objetivos para os instrumentos. No entanto, apresentaram como justificativa: "Tal solicitação se faz necessária pelo motivo: de melhor caracterizar a amostra de acordo com as características socioeconômicas e de saúde através dos dois instrumentos. Saliendo que a informação se faz relevante uma vez que piores prognósticos e o risco de desenvolver AVC estão também relacionados às condições socioeconômicas."

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não foram apresentados riscos e benefícios diferentes aos já propostos anteriormente, sugerindo que não há alteração.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A inclusão dos instrumentos é importante para a melhor caracterização da pesquisa, como bem justificado pelos pesquisadores.

Endereço: Rua Gonçalves Chaves, 373

Bairro: Centro

CEP: 96.015-560

UF: RS

Município: PELOTAS

Telefone: (53)2128-8050

Fax: (53)2128-8298

E-mail: cep@ucpel.edu.br



UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PELOTAS - UCPEL



Continuação do Parecer: 6.433.569

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos foram apresentados.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sugiro aprovação.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_222698_8_E1.pdf	06/10/2023 13:42:17		Aceito
Outros	ABEP.pdf	06/10/2023 13:38:13	ISABELA THUROW LEMES	Aceito
Outros	carta_emenda_adendo.pdf	06/10/2023 13:34:19	ISABELA THUROW LEMES	Aceito
Outros	ASSIST.pdf	06/10/2023 13:32:25	ISABELA THUROW LEMES	Aceito
Outros	carta_resposta_pendencia.pdf	31/08/2023 20:01:32	ISABELA THUROW LEMES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Corrigido_TERMOS_DE_CONSENTIMENTO_LIVRE_E_ESCLARECIDO.pdf	31/08/2023 19:52:40	ISABELA THUROW LEMES	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	CORRIGIDO_dissertacao_cep.pdf	31/08/2023 19:49:48	ISABELA THUROW LEMES	Aceito
Cronograma	cronograma_cep.pdf	09/08/2023 00:52:14	ISABELA THUROW LEMES	Aceito
Outros	Termo_de_Compromisso_para_Utilizacao_de_Prontuarios_Medicos.pdf	09/08/2023 00:50:22	ISABELA THUROW LEMES	Aceito
Outros	Termo_de_Compromisso_para_Utilizacao_de_Dados.pdf	09/08/2023 00:49:46	ISABELA THUROW LEMES	Aceito
Outros	Links_lattes_colaboradores.pdf	09/08/2023 00:48:51	ISABELA THUROW LEMES	Aceito
Orçamento	Orcamento_cep.pdf	09/08/2023 00:48:15	ISABELA THUROW LEMES	Aceito
Solicitação Assinada pelo Pesquisador Responsável	carta_de_apresentacao_cep.pdf	09/08/2023 00:47:54	ISABELA THUROW LEMES	Aceito
Outros	carta_de_autorizacao_HUSFP.pdf	09/08/2023 00:46:33	ISABELA THUROW LEMES	Aceito

Endereço: Rua Gonçalves Chaves, 373

Bairro: Centro

CEP: 96.015-560

UF: RS

Município: PELOTAS

Telefone: (53)2128-8050

Fax: (53)2128-8298

E-mail: cep@ucpel.edu.br



UNIVERSIDADE CATÓLICA DE
PELOTAS - UCPEL



Continuação do Parecer: 6.433.569

Recurso Anexado pelo Pesquisador	nihss_traduzida_e_adaptada_brasil.pdf	09/08/2023 00:45:13	ISABELA THUROW LEMES	Aceito
Outros	questionario_de_filtragem_dos_controle_s.pdf	09/08/2023 00:44:57	ISABELA THUROW LEMES	Aceito
Outros	Questionario_de_caracterizacao_da_amostra.pdf	09/08/2023 00:44:28	ISABELA THUROW LEMES	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto_CONEPassinada.pdf	09/08/2023 00:41:45	ISABELA THUROW LEMES	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PELOTAS, 18 de Outubro de 2023

Assinado por:
GABRIELE CORDENONZI GHISLENI
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Gonçalves Chaves, 373

Bairro: Centro

CEP: 96.015-560

UF: RS

Município: PELOTAS

Telefone: (53)2128-8050

Fax: (53)2128-8298

E-mail: cep@ucpel.edu.br