

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA
TOXICOLÓGICA**

**AVALIAÇÃO DE INDICADORES DO ESTRESSE
OXIDATIVO E DA ATIVIDADE DA ENZIMA
ACETILCOLINESTERASE SANGUÍNEA EM
PACIENTES COM DIAGNÓSTICO DE ACIDENTE
VASCULAR CEREBRAL ISQUÊMICO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

MAÍSA DE CARVALHO CORRÊA

Santa Maria, RS, Brasil

2006

**AVALIAÇÃO DE INDICADORES DO ESTRESSE OXIDATIVO
E DA ATIVIDADE DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE
SANGÜÍNEA EM PACIENTES COM DIAGNÓSTICO DE
ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL ISQUÊMICO**

por

Maísa de Carvalho Corrêa

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS),
como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Bioquímica Toxicológica

Orientadora: Maria Rosa Chitolina Schetinger
Co - orientadora: Maria Ester Pereira

SANTA MARIA, RS, BRASIL

2006

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de
Mestrado

**AVALIAÇÃO DE INDICADORES DO ESTRESSE OXIDATIVO E DA
ATIVIDADE DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE SANGÜÍNEA EM
PACIENTES COM DIAGNÓSTICO DE ACIDENTE VASCULAR
CEREBRAL ISQUÊMICO**

elaborada por
Maísa de Carvalho Corrêa

como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Bioquímica Toxicológica

Comissão examinadora:

Prof^a. Dra. Maria Rosa Chotolina Schetinger
(Presidente/Orientador)

Prof^o. Dr. Carlos Alexandre Netto (UFRGS)

Dra. Cleci Menezes Moreira (UFSM)

Santa Maria, 29 de setembro de 2006.

"Deus não escolhe os capacitados, capacita os escolhidos. Fazer ou não fazer algo só depende de nossa vontade e perseverança."

Dedicatória

***Dedico este trabalho aos meus pais pelo amor
incondicional, dedicação
e por sempre acreditarem em mim.***

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus pelo dom da vida e pela oportunidade de lutar pelos meus objetivos a cada dia por Ele concedido;

Em especial, aos meus pais que ensinaram-me, principalmente, a importância da construção e coerência de meus próprios valores. Obrigada pelo amor, pela compreensão e confiança em mim depositada;

A minha família pelo amor, apoio e carinho em todos os momentos da minha vida;

À professora Maria Rosa, por todos os ensinamentos, atenção e amizade durante estes anos de convivência; a minha gratidão;

A minha co – orientadora, professora Maria Ester, pela disponibilidade em me ajudar, contribuindo para a realização deste trabalho;

Aos colegas do Laboratório 2208, pelos momentos compartilhados e pela amizade durante o período de convívio;

As minhas amigas, Rosi e Paula pelo incentivo e por todo o carinho seja na forma de um abraço, de um sorriso ou de um e-mail, pois acredito que a única coisa que justifica a nossa existência são as relações que construímos;

A Rosélia, pela generosidade e pela grande contribuição neste trabalho;

Ao Gilberto e a Dani, obrigada pela colaboração e pelo carinho;

A Cíntia, minha IC, pela eficiência com que dedicou-se a me ajudar na realização deste trabalho;

Aos pacientes e seus familiares, que aceitaram participar deste projeto de pesquisa e compartilharam suas histórias de vida; meu muito obrigado;

A Dr^a Rosane Oliveira e aos funcionários da UTI e do PA do HUSM, obrigada pela colaboração;

Aos grandes amigos: Aline, Vivian, Liliane, Keli e Fernando pelo apoio, cumplicidade, por nos reconhecermos um no outro, por dividir nossas angústias e sonhos!

Aos professores do curso pelos ensinamentos;

Ao professor Carlos Alexandre Netto e a Cleci Moreira por aceitarem o convite para compor a banca examinadora desta dissertação;

A UFSM e ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica que há tantos anos forma e aperfeiçoa profissionais;

A Capes, pela bolsa concedida;

O maior perigo que se coloca para o agradecimento seletivo não é decidir quem incluir, mas decidir quem não mencionar. Aos amigos e pessoas que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização deste trabalho, gostaria de expressar minha profunda gratidão.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica
Universidade Federal de Santa Maria

AVALIAÇÃO DE INDICADORES DO ESTRESSE OXIDATIVO E DA ATIVIDADE DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE SANGÜÍNEA EM PACIENTES COM DIAGNÓSTICO DE ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL ISQUÊMICO

Autora: MAÍSA DE CARVALHO CORRÊA

Orientadora: MARIA ROSA SCHETINGER

Co – Orientadora: MARIA ESTER PEREIRA

Data e local de Defesa: Santa Maria, 29 de Setembro de 2006.

No acidente vascular isquêmico, o dano ao encéfalo é causado por uma redução ou um bloqueio completo do fluxo sangüíneo resultando em liberação deficiente de glicose e oxigênio. É uma das principais causas de mortalidade e incapacitação entre os idosos. Em sua maioria não são fatais e os sobreviventes têm alto risco de complicações vasculares subseqüentes. A hipertensão é o mais importante fator de risco para o acidente vascular cerebral, presente em 70% de todos os casos. Acredita-se que o estresse oxidativo é um dos mecanismos associados ao dano neuronal após o evento isquêmico. O papel chave que o sistema colinérgico desempenha nas funções normais do encéfalo e distúrbios de memória de vários processos patológicos assim como no controle do fluxo sangüíneo cerebral vem sendo bem documentado. Este trabalho investigou o perfil oxidativo e a atividade da enzima acetilcolinesterase sangüínea em pacientes com diagnóstico de acidente vascular cerebral isquêmico, na fase aguda e crônica assim como a influência da hipertensão em tal patologia. Determinou-se a atividade da catalase em sangue total, os níveis de glutathione reduzida em eritrócitos, TBARS e o conteúdo de proteína carbonil em amostras de soro da população estudada. O perfil oxidativo de lipídeos e proteínas, representado pelos níveis de MDA e conteúdo de proteína carbonil mostrou-se aumentado na fase aguda do evento isquêmico e no grupo hipertenso quando comparado com o controle. A atividade da catalase e os níveis de glutathione reduzida nos pacientes pertencentes ao estágio agudo encontraram-se aumentadas em relação aos grupos hipertenso e controle. Nenhuma

diferença na atividade da catalase foi encontrada entre pacientes do estágio crônico da isquemia cerebral e aqueles do grupo hipertenso ($p < 0,05$). A atividade da AChE sangüínea durante a fase aguda do acidente vascular isquêmico foi aumentada em relação àquela apresentada pelos grupos controle, hipertenso e crônico ($p < 0,05$). Também, nenhuma diferença foi observada entre o grupo crônico e o controle. O grupo hipertenso apresentou atividade da AChE significativamente menor que os outros grupos. Os resultados sugerem que o aumento da defesa antioxidante age como um mecanismo compensatório como consequência da superprodução de espécies reativas de oxigênio (EROs) após o evento isquêmico agudo. Este estudo também demonstrou que a hipertensão atua como um fator de risco prevalente para o acidente vascular isquêmico, contribuindo para o dano oxidativo celular. Os resultados também revelaram que a isquemia exerce efeito modulador na atividade da AChE em eritrócitos, a fim de manter adequados níveis do neurotransmissor acetilcolina (ACh) em resposta as diferentes fases da injúria neurológica causada pela isquemia. Conclui-se então que o evento isquêmico, apesar de ter localização definida, resulta em uma desordem sistêmica, induzindo mudanças, as quais podem ser detectadas pela medida de marcadores periféricos do estresse oxidativo e atividade da AChE sangüínea.

Palavras chave: acidente vascular isquêmico; estresse oxidativo; AVCi agudo; AVCi crônico; acetilcolinesterase.

ABSTRACT

Master Dissertation
Toxicological Biochemistry Post-Graduation
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

AVALIATION OF MARKERS OF OXIDATIVE STRESS AND OF ENZYME ACETYLCHOLINESTERASE IN WHOLE BLOOD FROM PATIENTS DIAGNOSED WITH ISCHEMIC STROKE

Author: MAÍSA DE CARVALHO CORRÊA
Oriented by: MARIA ROSA SCHETINGER
Co-oriented by: MARIA ESTER PEREIRA

Date and place of the defense: Santa Maria, September 29nd, 2006.

In ischemic stroke, damage to the brain is caused by a reduction or complete blockage of blood flow to parts of the brain, resulting in glucose and oxygen deficiency. It is a leading cause of mortality and disability particularly in the elderly. The majority of strokes are not fatal and survivors are at a high risk of subsequent vascular complications and new vascular accidents. Hypertension is the most important risk factor in strokes, being that it is present in 70% of all cases. Oxidative stress is believed to be one of the mechanisms taking part in neuronal damage in stroke. The key role the cholinergic system plays in normal brain functions and in memory disturbances of several pathological processes, such as in cerebral blood flow regulation, has been well documented. This study investigated the oxidative status and acetylcholinesterase (AChE) activity in whole blood in patients diagnosed with the acute and chronic stage of ischemia, as well as with hypertension. We determined the catalase activity in the blood, reduced glutathione (GSH) in erythrocytes, and TBARS and protein carbonyl content from serum samples. The oxidative profile of lipids and proteins represented by MDA levels and protein carbonylation content, respectively, showed increased levels both in the acute ischemic group and in the hypertensive group, when compared to the control. Catalase activity and GSH levels in the acute group also were higher than in the hypertensive and control groups. No difference was found between the catalase activity of the chronic ischemic group and the hypertensive group ($p < 0.05$). The activity of AChE in acute ischemic patients was significantly higher than that

presented by the control, hypertensive and chronic ischemic patients ($p < 0.05$). No significant difference was observed between the chronic and control groups. The hypertensive group presented AChE activity significantly lower than the other groups. The results suggest increased antioxidant defense as a compensatory mechanism in consequence of the overproduction of reactive oxygen species (ROS) after acute stroke. This study also demonstrated that hypertension, in and of itself, acts as a prevalent risk factor of stroke, contributing to oxidative cellular damage. Furthermore, the results revealed that ischemia exerted a modulator effect on AChE activity in erythrocytes, in an attempt to maintain adequate levels of the neurotransmitter acetylcholine (ACh), as a response to the different phases following neurological injury caused by ischemia. The ischemic event, in spite of having a defined location, results in a systemic disorder that induces changes, which can be detected by measuring the peripheral markers of oxidative stress and AChE activity in erythrocytes.

Keywords: ischemic stroke; oxidative stress; acute ischemic stroke; chronic ischemic stroke; acetylcholinesterase.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO DE LITERATURA

FIGURA 01 - Circulação sangüínea cerebral	22
FIGURA 02 - Acidente vascular hemorrágico e isquêmico.....	23
FIGURA 03 - Interrupção do fluxo sanguíneo pelo evento isquêmico.....	24
FIGURA 04 - Mecanismos envolvidos na morte neuronal após evento isquêmico.....	26
FIGURA 05 - Formação de espécies reativas de oxigênio	29
FIGURA 06 - Dano oxidativo à macromoléculas biológicas.....	30
FIGURA 07 - Dano a membranas celulares por lipoperóxidos	32
FIGURA 08 - Mecanismo enzimático antioxidante.....	35
FIGURA 09 - Papel da GSHPx e GSH na decomposição do peróxido de hidrogênio.....	37
FIGURA 10 - Estrutura química do neurotransmissor acetilcolina.....	41
FIGURA 11 - Isoformas da enzima AChE.....	46
FIGURA 12 - Interação do substrato (ACh) com o sítio esterásico da AChE.....	47
FIGURA 13 - Hidrólise da ACh pela enzima AChE.....	47
FIGURA 14 - Sítio esterásico contendo a tríade catalítica e externamente o sítio periférico aniônico (PAS).....	48

MANUSCRITO I

FIGURE 01 - MDA levels in hypertensive and acute and chronic ischemia groups. Each column represents mean \pm S.E. Duncan's multiple range test: groups that share different letters are statistically different.....	73
FIGURE 02 - Protein carbonylation content in hypertensive and acute and chronic ischemia groups. Each column represents mean \pm S.E. Duncan's multiple range test: groups that share different letters are statistically different.....	74

FIGURE 03 – Catalase activity in hypertensive and acute and chronic ischemia groups. Each column represents mean \pm S.E. Duncan's multiple range test: groups that share different letters are statistically different..... 75

FIGURE 04 – GSH levels in hypertensive and acute and chronic ischemia groups. Each column represents mean \pm S.E. Duncan's multiple range test: groups that share different letters are statistically different..... 76

MANUSCRITO II

FIGURE 01 – Erythrocyte AChE activity in hypertensive and acute and chronic ischemic groups. Each column represents mean \pm S.E. Duncan's multiple range test: groups that share different letters are statistically different..... 90

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA:

TABELA 1 - Principais fatores de risco o para acidente vascular cerebral.....27

MANUSCRITO I:

TABLE 1 - General characteristics of the patients..... 72

MANUSCRITO II:

TABLE 1 - General characteristics of the patients..... 89

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1. Objetivos	21
2. REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1. Fluxo sangüíneo cerebral	22
2.2. Acidente vascular cerebral	22
2.2.1. Acidente vascular cerebral isquêmico.....	24
2.2.1.1. Fatores de risco.....	26
2.2.1.1.1 Hipertensão.....	28
2.3. Estresse oxidativo	28
2.4. Indicadores pró-oxidantes	31
2.4.1. Lipoperoxidação.....	31
2.4.2. Oxidação protéica	33
2.5. Mecanismos antioxidantes	34
2.5.1. Catalase (CAT).....	35
2.5.2. Glutathiona reduzida (GSH).....	36
2.6. Déficit cognitivo <i>versus</i> acidente vascular cerebral	38
2.7. Sistema colinérgico	41

2.7.1. Colinesterases	42
2.7.2. Acetilcolinesterase (EC 3.1.1.7; AChE).....	43
2.7.3. Estrutura da acetilcolinesterase	44
2.7.4. Mecanismo catalítico.....	46
2.7.5. Sistema colinérgico <i>versus</i> endotélio.....	49
3. MANUSCRITOS	
3.1. MANUSCRITO I: Oxidative stress in hypertensive patients and in ischemic patients of both acute and chronic stages. Máisa de Carvalho Corrêa, Paula Maldonado, Cíntia Saydelles da Rosa, Rosilene Rodrigues Kaizer, Gilberto Lunkes, Daniele Sausen Lunkes, Maria Ester Pereira, Vera Maria Morsch, Maria Rosa Schetinger	51
3.2. MANUSCRITO II: Activity of AChE from whole blood of patients diagnosed with acute and chronic ischemia. Máisa de Carvalho Corrêa, Paula Acosta Maldonado, Cíntia Saydelles da Rosa, Rosilene Rodrigues Kaizer, Gilberto Lunkes, Daniele Sausen Lunkes, Maria Ester Pereira, Vera Maria Morsch, Maria Rosa Schetinger.....	78
4. DISCUSSÃO	92
5. CONCLUSÕES	96
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97

Apresentação

Esta dissertação está descrita na seguinte forma: primeiramente são apresentados a introdução, os objetivos e a revisão bibliográfica. A seguir, os resultados são apresentados na forma de manuscritos, os quais foram escritos seguindo-se as normas dos periódicos aos quais os mesmos foram submetidos à publicação. Os itens discussão e conclusões, dispostos após os manuscritos, contêm interpretações e comentários gerais referentes a ambos os manuscritos. As referências bibliográficas apresentadas no final da dissertação referem-se às citações que aparecem nos itens introdução, revisão de literatura e discussão.

1. INTRODUÇÃO

O sistema nervoso central (SNC) tem uma alta taxa de consumo de oxigênio e pelo seu estreito metabolismo aeróbico da glicose é totalmente dependente de um adequado fluxo sanguíneo (Halliwell, 1992). Quando este é perturbado, mesmo por um curto período de tempo, o resultado é o dano ou a morte celular (Zemke et al., 2004). Na isquemia, o dano cerebral é causado por uma redução ou bloqueio completo do fluxo sanguíneo, resultando em liberação deficiente de glicose e oxigênio (Dirnagl et al., 1999).

Os principais mecanismos envolvidos na morte neuronal pós-infarto isquêmico incluem a falha energética, excitotoxicidade, formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), sinalização apoptótica bem como processos inflamatórios (Lo et al., 2003).

O encéfalo é vulnerável ao estresse oxidativo devido à grande quantidade de ácidos graxos poliinsaturados e baixa capacidade de mecanismos de defesa de suas células neuronais (Halliwell, 1992; Margail et al., 2005).

O acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) em níveis citotóxicos no tecido encefálico concomitante com uma reduzida defesa antioxidante resulta em uma condição conhecida como estresse oxidativo durante a isquemia e a reperfusão. O estresse oxidativo vem sendo aceito como um dos principais fatores envolvidos na patogênese da injúria neuronal associada ao evento vascular isquêmico (Dirnagl et al., 1999). A produção de EROs sob baixas concentrações de oxigênio causa dano à organelas e à membrana plasmática, resultando na incapacidade da célula de controlar o fluxo iônico, levando à falha mitocondrial (Zemke et al., 2004). Dessa forma, o dano oxidativo à macromoléculas celulares como lipídeos, proteínas e ácidos nucléicos contribui na degeneração e morte neuronal (Sugawara et al., 2002).

A formação de proteína carbonil parece ser um fenômeno comum durante a oxidação protéica, e sua quantificação pode ser usada como medida da extensão da modificação oxidativa (Berlett & Stadman, 1997; Beal, 2003; Donne et al., 2003). Atuando na proteção contra o acúmulo de EROs existem vários mecanismos enzimáticos e não-enzimáticos. Assim, quando o estresse oxidativo ocorre como

conseqüência de um evento patológico, um sistema defensivo promove a regulação e a expressão dessas enzimas. O aumento significativo de produtos da lipoperoxidação ou a diminuição de alguns antioxidantes no plasma, são relatados em pacientes com doença cerebrovascular, e a presença do estresse oxidativo na injúria vascular cerebral vem sendo detectada por tais índices (Alexandrova & Bochev, 2005). A catalase atua na detoxificação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), desempenhando um papel importante na resposta adaptativa das células em condições patológicas (Matés, 1999).

A acetilcolina (ACh) é um neurotransmissor de grande significado na função do córtex cerebral. Este neurotransmissor está associado com a função cognitiva, o processamento da informação sensorial, a organização cortical do movimento e o controle do fluxo de sangue cerebral (Fibiger, 1991). Estudos prévios focados no mecanismo patogênético têm revelado que como na Doença de Alzheimer (DA), anormalidades colinérgicas estão associadas com distúrbios da função cognitiva em pacientes com demência vascular (Gottifries et al., 1994). A isquemia cerebral leva a uma restrição da síntese e disponibilidade de ACh e diminui a concentração tecidual de colina (Ch). Sugere-se que o prejuízo na transmissão colinérgica pode levar a uma progressiva deterioração da função deste sistema (Scremin et al., 1996). Portanto, torna-se aceitável, que déficits cognitivo e sensorio motor observados nesta patologia vêm, em parte, ser resultado de uma disfunção colinérgica central e periférica.

O papel chave que o sistema colinérgico desempenha nas funções normais do encéfalo e nos distúrbios de memória de várias patologias vem sendo bem documentado (Bartus et al., 1982). Apesar disso, não há consenso quanto a possíveis alterações da enzima colinérgica acetilcolinesterase (AChE) decorrente da isquemia. A atividade da AChE no líquido céfalo-raquidiano e em diferentes regiões cerebrais seguidas de isquemia tem sido relatada como diminuída (Malatová & Marsala, 1993; Malatová et al., 1999), aumentada (Ott et al., 1975; Schetinger et al., 1999) ou inalterada (Goldberg et al., 1985). Deve-se observar que eventos moleculares que expõem a mudanças na atividade da AChE induzidos pela isquemia devem ser avaliados pelo modelo experimental usado, oclusão revertida ou permanente e pela severidade da isquemia no tecido sob investigação. Apesar da disparidade dos dados, todos os estudos sugerem que a atividade da AChE deve estar alterada durante e após injúria isquêmica (Sáez-Valero et al., 2003).

A principal função da AChE é hidrolisar o neurotransmissor ACh nas sinapses colinérgicas terminando sua ação (Soreq & Saidman, 2001). Considerando que a interação da ACh com o seu receptor vai depender da eficiência catalítica da AChE, a atividade desta enzima pode ser usada como um índice da função colinérgica; isto é, mudanças na sua atividade podem indicar alterações na disponibilidade de ACh ao nível de receptor (Benedito et al., 1997).

As vias colinérgicas do SNC, as junções neuromusculares e os eritrócitos contêm principalmente AChE, enquanto o plasma apresenta principalmente a forma de butirilcolinesterase (BuChE) (Massoulié et al., 1993). Embora não esteja bem esclarecido o papel bioquímico da AChE eritrocitária, esta enzima apresenta sensibilidade similar àquela do SNC a diversos inibidores, tais como os organofosforados (Worek et al., 2004). Desta forma, a utilização de sangue, um material de coleta biológica pouco invasivo, poderia ser de fundamental importância como dado laboratorial auxiliando em conjunto com os demais testes clínicos no diagnóstico de um evento isquêmico.

Basedo no exposto acima é de interesse científico a avaliação da atividade da acetilcolinesterase sanguínea e dos indicadores do estresse oxidativo em pacientes com dano neurológico isquêmico.

1.1 OBJETIVOS

- Estimar a peroxidação lipídica pelas dosagens de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e a oxidação de proteínas pela carbonilação protéica em pacientes com diagnóstico de acidente vascular cerebral isquêmico (AVCi) na fase aguda e crônica desta patologia;
- Determinar a capacidade antioxidante plasmática e eritrocitária, através da atividade da enzima catalase e dos níveis de glutathiona reduzida, na população estudada;
- Avaliar a atividade da enzima acetilcolinesterase sanguínea em pacientes durante a fase aguda e crônica do evento isquêmico;
- Investigar a influência da hipertensão no perfil oxidativo e na atividade da AChE sanguínea na população estudada.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Fluxo sanguíneo cerebral

O sistema circulatório garante a chegada de nutrientes e de oxigênio a todos os órgãos, bem como a remoção de substâncias tóxicas decorrente do metabolismo celular. O encéfalo requer um contínuo suprimento de glicose e oxigênio para manter suas funções normais, e depende quase que exclusivamente da fosforilação oxidativa para a produção energética; assim, um constante fluxo sanguíneo é essencial para a distribuição de tais substratos aos neurônios (Dirnagl et al., 1999).

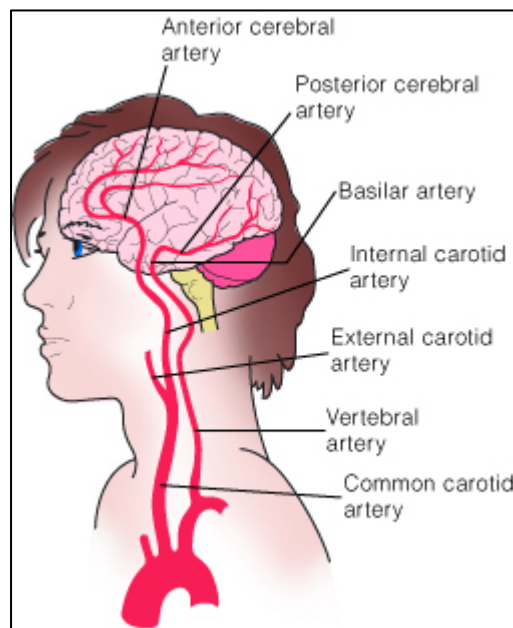


Figura 1 - Circulação sanguínea cerebral (http://www.besttreatment.co.uk/stroke_arteries)

2.2 Acidente vascular cerebral

O termo acidente vascular cerebral (AVC) refere-se à alteração do fluxo sanguíneo que mesmo por um curto período de tempo, leva ao dano ou morte

celular e conseqüentemente ao comprometimento funcional neurológico (Zemke e al., 2004).

Estudos epidemiológicos apontam a doença cerebrovascular como sendo a terceira maior causa de morte nos países industrializados e uma das maiores causas de incapacitação, apresentando um grande impacto sobre a população saudável (Alexandrova & Bochev, 2005). As causas de acidente vascular são divididas em duas principais categorias: hemorrágica e isquêmica (Figura 2).

No acidente vascular hemorrágico (AVCh) ocorre a ruptura de um vaso sanguíneo dentro da cavidade encefálica, provocando extravasamento de sangue e como conseqüência a injúria neurológica (Figura 2) (ZemKe et al., 2004). O acidente vascular cerebral isquêmico (AVCi) resulta de uma redução transitória ou permanente do fluxo sanguíneo cerebral. Entre as principais causas naturais da isquemia pode-se citar: trombose, embolismo e diminuição sistêmica da perfusão sanguínea (Lo et al., 2003; Zemke et al., 2004).

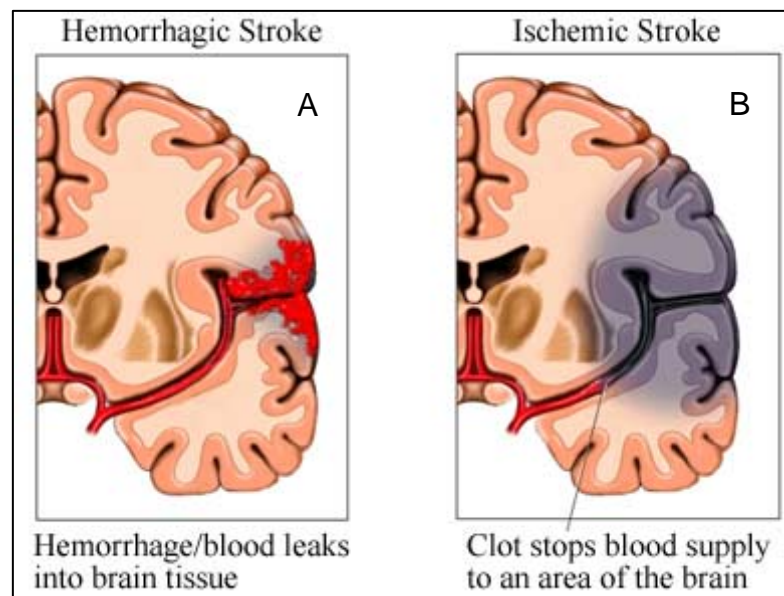


Figura 2 – Acidente vascular hemorrágico (A) e isquêmico (B)
([http:// www. healthgate. partnervs. org/ browsing](http://www.healthgate.partnervs.org/browsing))

Os sobreviventes de AVC têm um alto risco de complicações vasculares subseqüentes e de novos AVCs. Este é um problema de importância social e de grandes conseqüências econômicas, já que, atualmente, existe um elevado número de sobreviventes da doença cerebrovascular (Alexandrova & Bochev, 2005). Nas

últimas décadas, pesquisas estão sendo realizadas a fim de entender os mecanismos bioquímicos envolvidos no dano ao encéfalo e com isso desenvolver novos tratamentos (Alexandrova & Bochev, 2005).

2.2.1 Acidente vascular cerebral isquêmico (AVCi)

A interrupção do fluxo sanguíneo cerebral (Figura 3) concomitante com a falha do processo celular normal durante a isquemia desencadeia uma cascata de eventos moleculares, os quais são responsáveis pela produção de substâncias tóxicas (Culmsee & Krieglstein, 2005). Os principais mecanismos envolvidos na morte neuronal pós-infarto isquêmico incluem a falha energética, excitotoxicidade, acúmulo de EROs, sinalização apoptótica, bem como, processos inflamatórios (Lo et al., 2003).

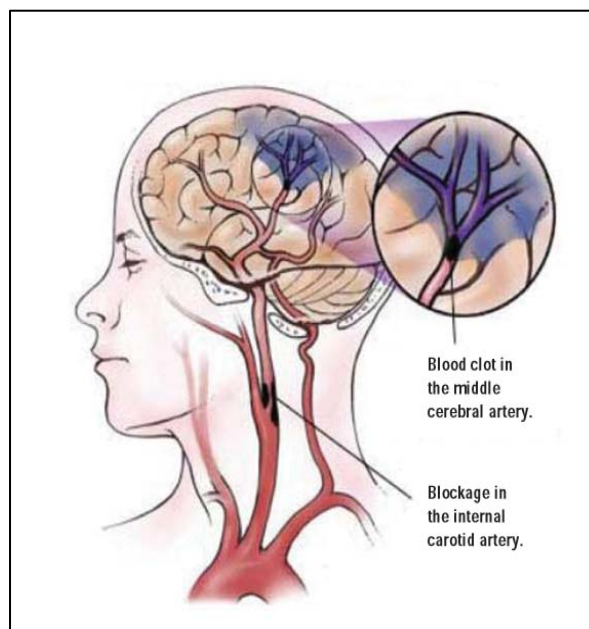


Figura 3 - Interrupção do fluxo sanguíneo pelo evento isquêmico
([http:// www.devicelink.com/ivdt](http://www.devicelink.com/ivdt))

A depleção de ATP (adenosina trifosfato) altera a função celular por interromper processos dependentes de ATP, primeiramente a Na^+/K^+ ATPase, provocando a falha no controle do gradiente iônico através das membranas. Esta falha causa um aumento na concentração extracelular de K^+ assim como o influxo de Na^+ , Cl^- e Ca^{2+} para dentro das células (Moro et al., 2005). A liberação excessiva de glutamato desempenha um papel essencial na patogênese da injúria cerebral isquêmica, denominado excitotoxicidade (Culmsee & Krieglstein, 2005). O acúmulo citotóxico de cálcio intracelular vem sendo bem estabelecido como central na morte neuronal decorrente do evento isquêmico, levando à sobrecarga mitocondrial, inibição da produção de ATP e a alterações de fosfolipídeos, proteínas e ácidos nucléicos pela ativação de fosfolipases, proteases e endonucleases Ca^{2+} -dependentes, respectivamente (Moro et al., 2005). O influxo de íons Na^+ , provoca o acúmulo de água dentro da célula, levando ao edema (Zemke et al., 2004). Os radicais livres e outras espécies oxidantes, geradas durante a isquemia cerebral podem reagir destruindo organelas e a membrana plasmática, também contribuindo para a disfunção da barreira hemato-encefálica e edema tecidual. A disfunção mitocondrial resulta do estresse oxidativo, da falha energética e da perda da homeostase celular do cálcio, levando a mudanças na permeabilidade mitocondrial iônica (Culmsee & Krieglstein, 2005; Moro et al., 2005). Além disso, moléculas normalmente confinadas à mitocôndria, como o citocromo c, são liberadas no citoplasma, onde podem ligar-se aos inibidores das caspases, inativando-os; enzimas que destroem o DNA podem também ser liberadas. Ambos os fatores estão envolvidos no processo de apoptose, que leva a morte celular (Zemke et al., 2004).

A injúria isquêmica está também associada à resposta inflamatória, na qual vários mediadores são liberados ou ativados, tal como citocinas e moléculas de adesão, estimulando a infiltração de leucócitos no parênquima encefálico (Moro et al., 2005). A morte neuronal que ocorre como consequência, vem sendo, portanto, associada a todos estes eventos em conjunto (Figura 4) (Onteniente et al., 2003). Inúmeros mecanismos de proteção são iniciados pelo organismo em resposta aos processos danosos da isquemia.

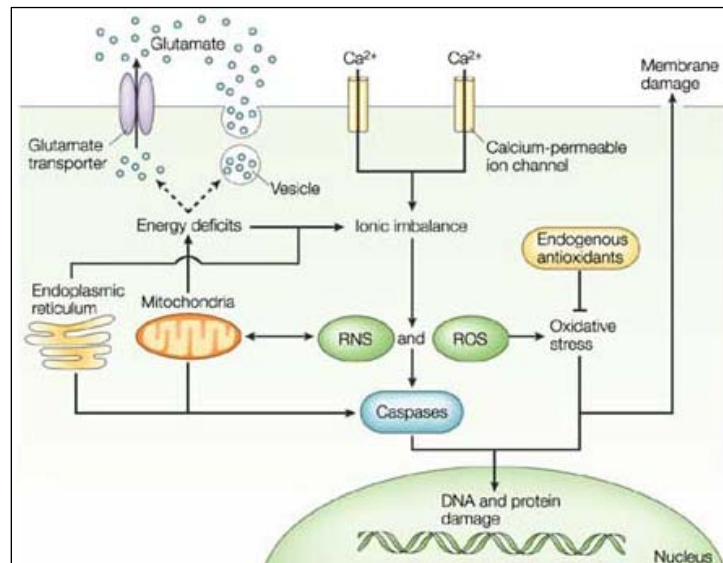


Figura 4 - Mecanismos envolvidos na morte neuronal após evento isquêmico (adaptado de Lo et al., 2003).

2.2.1.1 Fatores de Risco

Considerando o acidente vascular cerebral um estado de emergência, a identificação e tratamento efetivo dos principais fatores de risco podem desempenhar um importante papel na sua prevenção. Os fatores de risco para AVC isquêmico são múltiplos e combinados (Tabela 1), refletindo a heterogeneidade da doença.

Dentre os fatores de risco não modificáveis, a idade é o mais importante, acometendo principalmente idosos com idade superior a 65 anos, sendo levemente mais prevalente em homens. Em relação à raça, africanos e americanos têm risco mais alto de doença cerebrovascular do que os caucasianos (Cubrilo -Turek, 2004).

Em relação aos fatores modificáveis, o *Diabete mellitus* constitui um importante risco para o desenvolvimento de doença cerebrovascular, por interagir com outros fatores, como hipertensão e hiperlipidemia, os quais potencializam o risco.

Tabela 1: Principais fatores de risco para acidente vascular cerebral.

Não-modificáveis	Modificáveis
Idade	Hipertensão
Sexo	Fumo
Etnia/Raça	Doenças cardíacas
História familiar de AVC/ATI	<i>Diabete mellitus</i>
	Consumo excessivo de álcool
	Estenose assintomática da carótida

Os mecanismos etiopatogênicos do AVC e do acidente transitório isquêmico (ATI) nos diabéticos, se devem a alterações da hemodinâmica cerebral, à hiperglicemia e a outros fatores de risco associados.

O fumo é particularmente importante quando combinado com outros fatores como hipertensão e/ou *Diabete mellitus*, sendo uma causa independente para o AVC isquêmico em ambos os sexos (Chaves, 2000).

Cardiopatias recentes, especialmente a isquêmica, e hipertensão, estão fortemente associadas com maior risco de fibrilação atrial, sendo que esta patologia aumenta o risco de doença cerebrovascular de 4 a 5 vezes. É bem estabelecido que a dislipidemia é um dos principais fatores de risco para doenças vasculares, principalmente entre os pacientes diabéticos que por sua vez, apresentam alta incidência de hipertensão arterial (Pires et al., 2004). Apesar disso, o papel da hipercolesterolemia no risco de evento cerebrovascular é ainda incerto. Ao contrário da doença coronariana, relações diretas entre risco de AVC e colesterol sérico ou LDL, ou inversas com colesterol HDL não estão ainda bem estabelecidas (Cubrilo-Turek, 2004; Pires et al., 2004). Segundo Pires et al. (2004) a dislipidemia foi encontrada em 15,6 % dos pacientes idosos com AVCi em ambos os sexos e em ambas as faixas etárias estudadas (60 a 70 anos e mais que 71 anos). Dentre todos os fatores modificáveis, a hipertensão arterial constitui o mais importante tanto para o acidente cerebrovascular isquêmico como para o hemorrágico (Cubrilo-Turek, 2004).

2.2.1.1.1 Hipertensão

A hipertensão arterial é o maior problema de saúde nos países desenvolvidos, bem como daqueles em desenvolvimento. Está presente em 60 a 70% da população com idade superior a 60 anos, aumentando o risco de doença cardiovascular, cerebrovascular e renal (Cubriilo-Turek, 2004).

No Brasil, a hipertensão arterial é o fator de risco mais importante para a doença cerebrovascular, cuja estimativa de prevalência está em torno de 11 a 20% acima dos 20 anos, e 35% acima dos 50 anos. Aproximadamente 85% dos pacientes com diagnóstico de AVC são hipertensos (Chaves, 2000).

Embora se saiba da relação entre a hipertensão e o acidente vascular isquêmico, ainda não está claro se a pressão diastólica elevada ou a hipertensão sistólica isolada apresentam riscos distintos, mas a excessiva valorização da pressão diastólica para avaliar o risco pode ser inadequada na idade avançada (Chaves, 2000).

A avaliação da relação entre hipertensão sistólica isolada e outros fatores de risco com subtipos de AVC isquêmico e hemorrágico em idosos demonstrou associação de idade, fumo, diabetes, pressão sistólica elevada, baixo colesterol HDL e anormalidades eletrocardiográficas com incidência aumentada de doença cerebrovascular, ATI ou AVC isquêmico (Fuchs et al., 2000).

Entre os sobreviventes ao evento isquêmico, o risco de doença vascular recorrente é alto, e a terapia antihipertensiva é conhecida por reduzir a mortalidade após AVC. Recentes triagens com intervenção clínica têm demonstrado a importância de um controle rígido da pressão sanguínea na prevenção de isquemia recorrente (Ohta et al., 2005).

2.3 Estresse oxidativo

Quando o oxigênio é parcialmente reduzido, tanto na fosforilação oxidativa quanto em outras reações, há formação de radicais livres, que constituem moléculas com coexistência independente (o que explica o uso do termo “livre”) e que contém

um ou mais elétrons não pareados na camada de valência (Figura 5). Esta configuração faz dos radicais livres espécies altamente instáveis, de meias-vidas relativamente curtas e quimicamente muito reativas (Ferreira & Matsubara, 1997).

O estresse oxidativo é um estado de desequilíbrio entre a produção de radicais livres, em particular EROs, e a capacidade de defesa do organismo contra essas espécies, levando a um progressivo dano oxidativo.

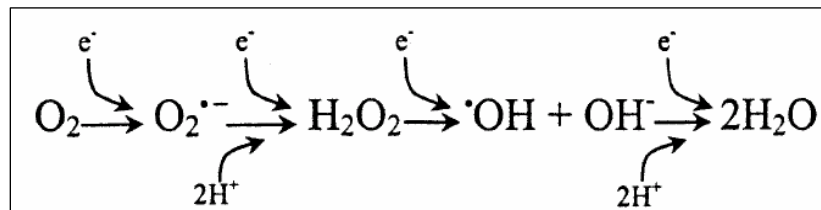


Figura 5 – Formação de espécies reativas de oxigênio (Nordberg & Arner, 2001).

Mesmo sob condições fisiológicas, o metabolismo neuronal e glial produz EROs. Aproximadamente 2-5% do fluxo de elétrons da cadeia respiratória em mitocôndrias isoladas de cérebro produz ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet -}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Halliwell, 1992).

Acredita-se que o estresse oxidativo é um dos mecanismos que desempenha papel central no processo patofisiológico durante o evento isquêmico, e a degeneração neuronal resultante vem sendo associada com o aumento da produção de radicais livres (Alexandrova and Bochev, 2005). Durante a isquemia cerebral, inúmeros eventos predisõem o encéfalo à formação de EROs, como o rápido decréscimo nos níveis de ATP, perda da homeostase do Ca^{2+} , excitotoxicidade, metabolismo e liberação do ácido araquidônico, disfunção mitocondrial, acidose e edema (Cao et al., 1988).

A reperfusão, após isquemia cerebral, eleva a formação de espécies pró-oxidantes no tecido encefálico, as quais podem contribuir para a injúria neuronal por atacar diretamente macromoléculas, incluindo proteínas, lipídeos e DNA, ou indiretamente atingindo os caminhos de sinalização celular e regulação da expressão gênica (Figura 6) (Moro et al., 2005).

Existem várias evidências a partir de modelos experimentais de formação aumentada de radicais livres no encéfalo durante a isquemia/reperfusão (Homi et al.,

2002; Danielisová et al., 2005). Estudos clínicos, com medidas diretas verificando a relação entre acidente cerebrovascular isquêmico e o estresse oxidativo são ainda deficientes, principalmente devido às dificuldades morfológicas encontradas na determinação de radicais livres no tecido encefálico.

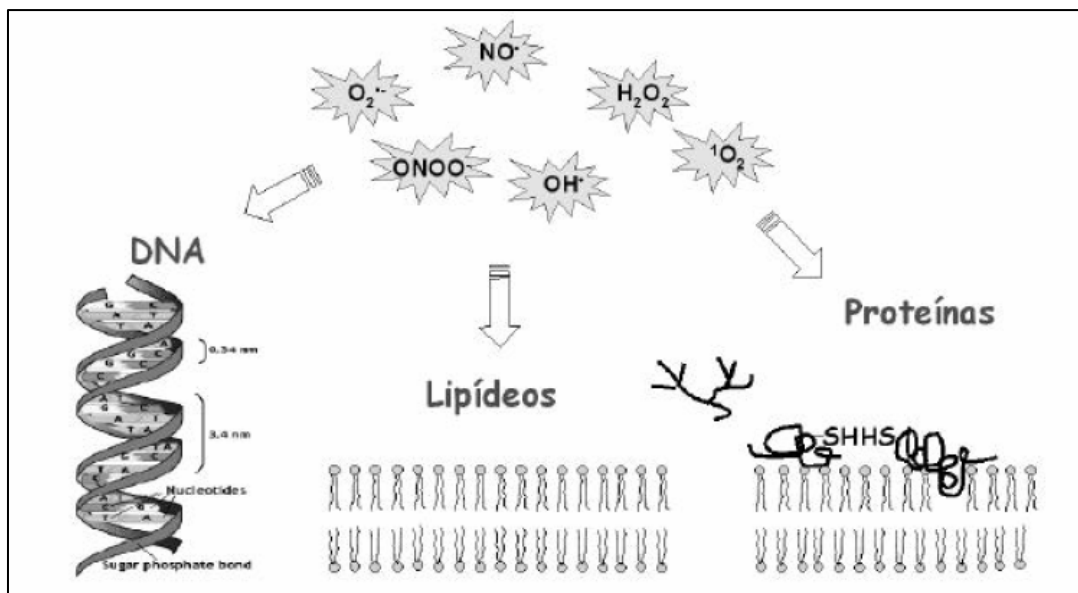


Figura 6 - Dano oxidativo à macromoléculas biológicas (Torres, 2003).

As EROs iniciam uma cadeia complexa de reações que produz uma variedade de estruturas moleculares, muitas das quais são ainda desconhecidas (Alexandrova and Bochev, 2005). Assim, substâncias biológicas que possam ser possíveis marcadores periféricos no evento isquêmico estão sendo investigadas, já que a medida direta de radicais livres e moléculas oxidadas no encéfalo são difíceis em humanos (Cherubine et al., 2005).

O equilíbrio entre a geração e a neutralização de oxidantes por diferentes mecanismos de defesa intra e extracelular ajuda a proteger os componentes vitais da célula (Zimmermann et al., 2004). A atividade enzimática antioxidante do tecido afetado pela isquemia/reperfusão é particularmente importante como defesa endógena primária contra as espécies pró-oxidantes que induzem a injúria (Homi et al., 2002). Assim, a capacidade antioxidante plasmática pode ser um importante fator que fornece proteção contra o dano neurológico causado pelo estresse oxidativo associado ao evento vascular isquêmico (Leinonen et al., 2000).

Durante a fase recente após isquemia/reperfusão, os antioxidantes podem se mobilizados, embora essa capacidade possa ser limitada, em função do tempo, pela sua baixa disponibilidade ou excessivo estresse oxidativo (Spranger et al., 1997). O aumento de produtos da lipoperoxidação, e/ou a diminuição de alguns antioxidantes no plasma, são relatados em pacientes com doença cerebrovascular e a presença do estresse oxidativo pode ser detectada a partir destes indicadores (Alexandrova & Bochev, 2005).

Considerando-se o exposto acima, o estresse oxidativo pode ser considerado um alvo importante para o desenvolvimento de fármacos, que ao reduzir o dano oxidativo, confere proteção aos componentes celulares. Uma variedade de agentes com potencial terapêutico para reduzir o dano oxidativo vem sendo estudado na fase aguda do evento isquêmico, baseado em diferenças conceituais e farmacológicas. A complexidade da doença pode explicar como compostos com diferentes modos de ação asseguram proteção celular. A terapia antioxidante mostra bons resultados em modelos experimentais de acidente vascular, mas sua eficácia ainda não tem sido confirmada em estudos clínicos mais amplos (Alexandrova & Bochev, 2005).

2.4 Indicadores pró-oxidantes

2.4.1 Lipoperoxidação

O dano aos lipídeos induz o fenômeno conhecido como lipoperoxidação (Figura 7). Um dos bem conhecidos produtos da lipoperoxidação é o malondialdeído (MDA) (Alexandrova & Bochev, 2005; Cherubini et al., 2005), o qual é o produto final da degradação não enzimática de ácidos graxos poliinsaturados; altos níveis de MDA elevam a formação de lipoperóxidos e indicam um aumento da lipoperoxidação (Kashyap et al., 2005).

Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação de EROs, porém a membrana plasmática é um dos mais atingidos em decorrência da peroxidação lipídica, o que provoca alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares

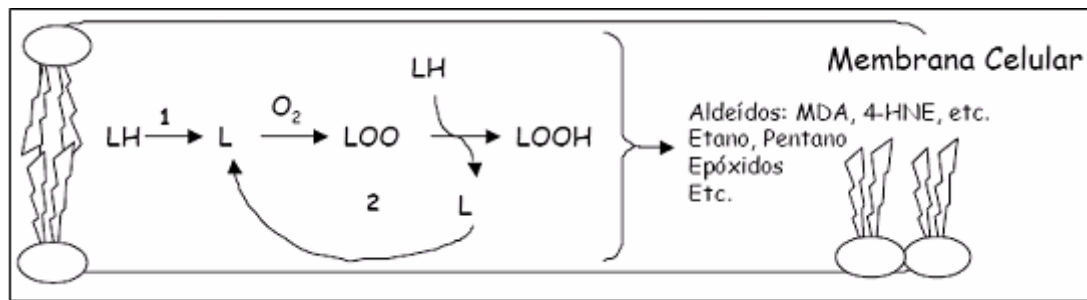


Figura 7 – Dano a membranas celulares por lipoperóxidos (adaptado de Torres, 2003).

Com isso, há perda da seletividade na troca iônica e da liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas, e a formação de produtos citotóxicos, culminando com a morte celular. A lipoperoxidação também pode estar associada aos mecanismos de envelhecimento, de câncer e a exacerbação da toxicidade de xenobióticos (Ferreira & Matsubara, 1997). O radical hidroxila (OH[•]) é freqüentemente reconhecido como a espécie iniciadora e a mais importante da lipoperoxidação. Entretanto, estudos indicam que o ferro também desempenha papel determinante na iniciação deste processo, sendo necessária uma relação equimolar Fe³⁺: Fe²⁺ no meio (Ferreira & Matsubara 1997).

Vários estudos demonstram níveis elevados de MDA séricos em pacientes com diagnóstico de acidente vascular cerebral agudo (Demirkaya et al., 2001; Polidori et al., 2002; Bolokadse et al., 2004). Tais estudos foram realizados na fase aguda do acidente isquêmico, imediatamente após o evento.

A hipertensão arterial está ligada diretamente à formação de radicais livres. Estudos relatam o aumento dos níveis plasmáticos de MDA em pacientes hipertensos quando comparados à população normotensa (Russo et al., 1998; Kashyap et al., 2005). Desde que existe uma estreita relação entre produtos da lipoperoxidação e hipertensão, *Diabete mellitus*, dislipidemia ou aterosclerose, que estão freqüentemente presentes em pacientes isquêmicos, altos níveis de MDA séricos detectados nesses pacientes podem ser independentes do evento isquêmico (Bir et al., 2006).

Estudos monitorando mudanças em indicadores do estresse oxidativo durante a fase crônica após doença cerebrovascular são escassos. Dentre aqueles que medem produtos da peroxidação lipídica no estágio crônico da doença

cerebrovascular isquêmica, os resultados são conflitantes (Wher et al., 2000; Alexandrova et al., 2003). De acordo com Bir et al. (2006), níveis elevados de MDA séricos foram detectados em pacientes com AVC isquêmico seis meses após o evento agudo, em ambos os tipos de infarto, lacunar e aterotrombótico. Os autores também assumem que os fatores de risco hipertensão, Diabete mellitus ou dislipidemia não podem isoladamente ser responsáveis por altos níveis séricos de MDA.

2.4.2 Oxidação protéica

As EROs podem danificar todos os tipos de moléculas biológicas, sendo as proteínas alvos imediatos para a modificação oxidativa. O dano à estrutura protéica pode alterar sua atividade biológica, sendo que no caso de enzimas, poderia resultar em modificação de sua atividade catalítica. Além disso, estas alterações ainda poderiam causar prejuízo no transporte ativo através das membranas celulares e citólise (Dean et al., 1997). A formação da proteína carbonil parece ser um fenômeno comum durante a oxidação, e sua quantificação pode ser usada para medir a extensão do dano oxidativo (Berlett & Stadman, 1997; Beal, 2003; Donne et al., 2003).

Os grupos carbonil (CO), (aldeídos e cetonas) são produzidos pela oxidação da cadeia lateral de aminoácidos suscetíveis, especialmente: prolina (Pro), arginina (Arg), lisina (Lis) e treonina (Tre). Estes também podem ser gerados através da clivagem oxidativa das proteínas, tanto por α amidação quanto por oxidação das cadeias laterais de glutamato, levando a formação de um peptídeo no qual o aminoácido N-terminal está bloqueado por um derivado α -cetoacil. Também, os grupos carbonil (CO) podem ser introduzidos nas proteínas por uma reação secundária das cadeias laterais nucleofílicas de Cys (cisteína), His (histidina) e Lis com aldeídos produzidos durante a peroxidação lipídica (como o malondialdeído entre outros). Além disso, derivados carbonil reativos (cetoaminas, cetoaldeídos) gerados como uma consequência da reação de açúcares redutores, ou seus produtos de oxidação com resíduos de Lis das proteínas (reações de glicação ou

glicooxidação) com a eventual formação de produtos finais de glicação-lipoxidação avançados, podem levar a formação de grupos carbonil (Donne et al., 2003).

As proteínas modificadas oxidativamente são produtos quimicamente estáveis, sendo um fator importante para a sua detecção e armazenamento (Rutkowska et al., 2005). O conteúdo de proteína carbonil é atualmente o marcador de oxidação protéica mais usado e observa-se o aumento em várias doenças humanas como: Doença de Alzheimer (DA), *Diabete mellitus*, processos inflamatórios e artrite reumatóide. É importante citar que níveis elevados de proteína carbonil são indicadores não somente de estresse oxidativo, mas também de doenças derivadas do metabolismo protéico (Donne et al., 2003).

De acordo com Chang et al. (1998), em estudo envolvendo pacientes com déficit neurológico em decorrência de acidente isquêmico agudo, o conteúdo de proteína carbonil plasmática não foi alterado nas 24 horas após o início do evento isquêmico.

Oliver et al. (1990) em um modelo de isquemia/reperfusão em córtex cerebral de roedores, encontraram um aumento no conteúdo de proteína carbonil após 10 minutos de oclusão seguidos por diferentes tempos de reperfusão. O conteúdo de proteína carbonil aumentou progressivamente em função do tempo de reperfusão exibindo máxima mudança em 2 horas. Após esse tempo, os níveis diminuíram significativamente, mas ainda permaneceram levemente mais altos que aqueles encontrados para o controle até 24 horas após reperfusão, indicando que o evento isquêmico tem influência significativa no processo de injúria protéica.

2.5 Mecanismos antioxidantes

O equilíbrio entre a geração e a neutralização de oxidantes por diferentes mecanismos de defesa intra e extracelular é responsável pela manutenção dos componentes celulares vitais (Zimmermann et al., 2004). A defesa enzimática envolve a ação cooperativa de três principais enzimas intracelulares antioxidantes: superóxido dismutase (SOD) que é encontrada no citosol (Cu/Zn-SOD) e na mitocôndria (Mn-SOD), glutatona peroxidase (GSHPx) e catalase (CAT) que estão presentes no citosol e peroxissomos, respectivamente (Figura 8) (Nordberg & Arner,

2001). Já os antioxidantes não-enzimáticos incluem: ácido ascórbico (vitamina C), α tocoferol (vitamina E), glutationa (GSH), β caroteno e vitamina A (Matés et al., 1999).

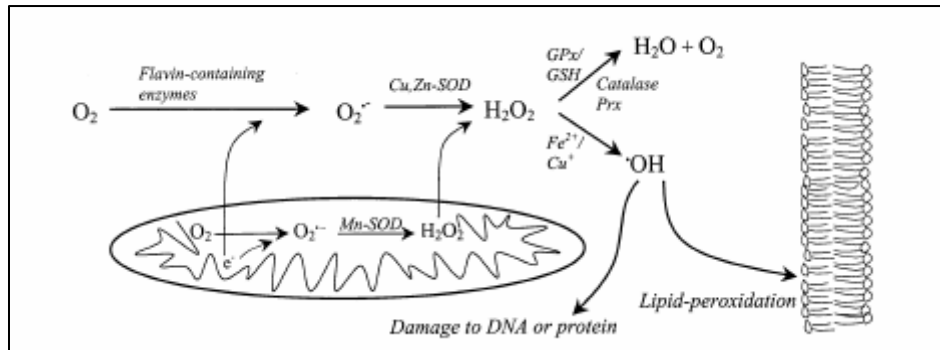


Figura 8- Mecanismo enzimático antioxidante (Nordberg & Arner, 2001).

2.5.1 Catalase (CAT)

A catalase (EC 1.11.1.6; CAT) é uma enzima tetramérica, consistindo de quatro subunidades idênticas de 60 KDa, que contém um único grupo ferroprotoporfirina por unidade, e tem uma massa molecular de aproximadamente 240 KDa. A catalase reage eficientemente com o H_2O_2 para formar H_2O e O_2 (Matés et al., 1999). A enzima é encontrada no sangue, medula óssea, mucosas, rim e fígado e sua atividade é dependente de NADPH (Ferreira & Matsubara, 1997).

Apesar de não ser um radical livre, pela ausência de elétrons desemparelhados na última camada, o H_2O_2 é um metabólito do oxigênio extremamente deletério, porque participa da reação que produz o radical hidroxila ($\cdot OH$). O H_2O_2 tem vida longa, é capaz de atravessar camadas lipídicas, pode reagir com a membrana eritrocitária e com proteínas ligadas ao Fe^{2+} (Ferreira & Matsubara, 1997). Apesar da CAT não ser essencial para alguns tipos celulares sob condições normais, ela desempenha um papel importante na aquisição de tolerância ao estresse oxidativo e na resposta adaptativa das células (Matés et al., 1999).

Danielisová et al. (2005), avaliaram o papel da SOD e da CAT no tecido encefálico em um modelo experimental de isquemia em ratos, induzido pela oclusão dos quatro vasos. A atividade das enzimas antioxidantes foi medida no córtex, hipocampo e estriado após 5 minutos de isquemia com diferentes tempos de

reperfusão (5 horas, 1 e 2 dias). As atividades da SOD e da CAT apresentaram-se aumentadas, sendo que a CAT alcançou seu pico 24 horas após a reperfusão. Para melhor entender o mecanismo que levou a maior atividade das enzimas antioxidantes avaliadas, o trabalho investigou a influência da ciclohexamida, um inibidor da síntese protéica; os autores sugerem que este aumento foi causado pela síntese das enzimas durante as primeiras horas após o evento isquêmico que apesar de estar aumentada, não foi suficiente para proteger neurônios das regiões mais vulneráveis principalmente o hipocampo.

Homi et al. (2002) também utilizaram um modelo experimental para avaliar a atividade antioxidante após 15 minutos de isquemia, seguidos por 3 horas de reperfusão. As atividades da SOD e da CAT mostraram-se reduzidas principalmente no hipocampo e estriado cerebral. Os autores sugerem que na fase recente após a isquemia/reperfusão a redução nas atividades de tais enzimas deve estar relacionada com a alta suscetibilidade do hipocampo e estriado ao dano oxidativo.

Em humanos, Casado et al. (2004) em estudo com 45 pacientes diagnosticados com infarto isquêmico agudo, avaliaram a atividade de enzimas antioxidantes relacionando-as com o grau de déficit neurológico. As amostras foram coletadas após 1, 3, 6 e 15 dias; a atividade da CAT apresentou-se elevada no grupo isquêmico, sendo que os pacientes classificados com maior dano neurológico apresentaram ainda maior atividade da CAT.

Pesquisas envolvendo pacientes hipertensos mostram resultados conflitantes em relação à atividade antioxidante (Redon et al., 2003; Kornatowska et al., 2004). Redon e colaboradores (2003) encontraram redução na atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GSH-Px em pacientes hipertensos. Segundo Kornatowska et al. (2004) não foi encontrada diferença significativa na atividade da CAT e GSH-Px em relação à atividade dessas enzimas na população idosa normotensa.

2.5.2 Glutathiona reduzida (GSH)

A GSH, o mais abundante composto tiol presente em todos os tecidos dos mamíferos é um tripeptídeo formado pelos resíduos de glicina, glutamato e cisteína.

O primeiro passo na sua síntese é a condensação do grupo γ -carboxila do glutamato com o grupo α -amino da cisteína. O grupo carboxila é ativado primeiro por ATP para formar o intermediário acil-fosfato, o qual é atacado pelo grupo amina da cisteína. O segundo passo é similar, com o grupo α -carboxila da cisteína ativado, formando um acil-fosfato que permite a condensação com a glicina (Gul et al., 2000). A GSH está envolvida em várias funções fisiológicas: mantém os grupos SH das proteínas no estado reduzido, participa no transporte de aminoácidos e detoxificação de toxinas, atua enzimaticamente degradando peróxidos endógenos, forma moléculas bioativas e atua como coenzima em várias reações enzimáticas (Stamler & Slivka, 1996).

A GSH participa na decomposição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), potencialmente tóxico, que é convertido em H_2O em reação catalisada pela GSHPx, às custas da glutathiona reduzida; a glutathiona oxidada resultante é reciclada à forma reduzida pela glutathiona redutase e NADPH (Figura 9) (Gul et al., 2000). O NADPH é regenerado pela via das pentoses fosfato, em reação catalisada pela glicose 6-fosfato desidrogenase, a qual é particularmente importante nos eritrócitos. Dessa forma, este processo de reciclagem e a manutenção de níveis adequados de GSH podem prevenir o dano celular causado pelo estresse oxidativo (Stamler & Slivka, 1996).

Níveis diminuídos de GSH vêm sendo encontrados em inúmeras doenças neurodegenerativas, em condição de estresse oxidativo, assim como no processo normal do envelhecimento (Zimmermann et al., 2004).

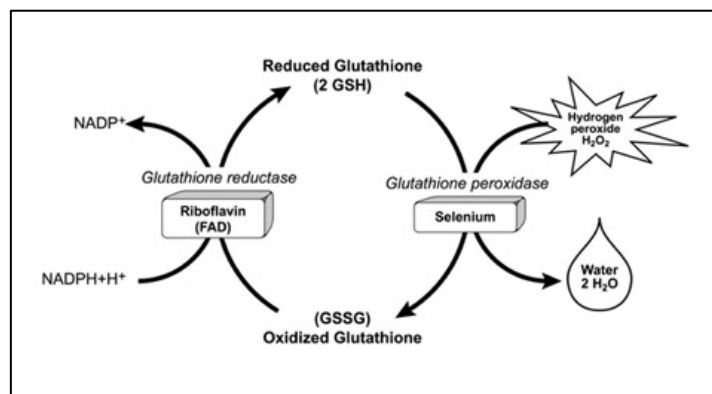


Figura 9- Papel da GSHPx e GSH na decomposição do peróxido de hidrogênio ([http:// www. lpi.oregonstate.edu/selenium/gsh](http://www.lpi.oregonstate.edu/selenium/gsh))

Shimizu et al. (2004) investigaram a relação entre os níveis de GSH plasmáticos e os tipos clínicos de doença vascular, incluindo AVC e doenças cardiovasculares; de forma geral os níveis de GSH na população com diagnóstico de doença vascular foram menores quando comparados com o grupo controle.

Zimmermann et al. (2004) compararam a capacidade antioxidante de pacientes durante a fase aguda do AVCi com a de um grupo no estágio convalescente da doença, considerados pacientes com risco potencial para doença cerebrovascular recorrente. Os resultados mostraram níveis de GSH elevados durante as primeiras horas após evento isquêmico agudo, e níveis baixos de GSH em dois terços dos pacientes em estágio convalescente. Os autores sugerem que, no primeiro grupo, o aumento de GSH provavelmente faça parte de um mecanismo contra o dano oxidativo, através da neuroproteção contra a excitotoxicidade em decorrência do acidente vascular. No segundo caso, a redução nos níveis de GSH poderia estar associada ao aumento do estresse oxidativo e arterosclerose.

2.6 Déficit cognitivo *versus* acidente vascular cerebral

A demência é uma doença crônica caracterizada pela progressiva deterioração da função cognitiva, afetando a memória, o aprendizado, a capacidade de julgamento e organização dentro do tempo e espaço. Com o passar do tempo, esse déficit cognitivo tem maior impacto na habilidade dos pacientes em realizar atividades rotineiras, os quais passam a depender de assistência para executar tais funções e mais tarde para os próprios cuidados pessoais. Na maioria dos pacientes, a demência desenvolve-se lentamente, tornando-se mais prevalente na população com idade superior a 60 anos. Entretanto, ela pode ter ocorrência repentina seguindo a injúria cerebral ou o infarto cardíaco (Grantham & Geerts, 2002).

A demência vascular é a segunda forma mais comum de demência, depois da DA, representando 15-20% de todos os casos. A demência vascular resulta de um acidente cerebrovascular hemorrágico ou isquêmico, assim como injúria cerebral isquêmica decorrente da redução do fluxo sanguíneo, resultando de desordens cardiovasculares e circulatórias. O aumento natural da incidência de doença isquêmica cardíaca e de acidente vascular cerebral com o envelhecimento da

população e o reconhecimento da importante contribuição da doença cerebrovascular na patologia da DA, resultará em um aumento da importância da demência vascular como causa primária da demência e como um coadjuvante crítico nas demências degenerativas (Román, 2005). Além disso, estudos neuropatológicos têm demonstrado que a ocorrência da DA com concomitante doença cerebrovascular, podem estar presente em um número superior a 30% de todos os casos de demência (Kalaria & Ballard, 1999).

Apesar de estar bem estabelecida a relação entre injúria vascular isquêmica e o desenvolvimento de demência, a falta de consenso na definição da demência vascular e no estabelecimento de apropriados critérios diagnósticos para estudos neuroepidemiológicos levou Hachinski (1994) a propor o termo prejuízo cognitivo vascular. Este termo abrange características amplas para substituir a demência vascular, incluindo todas as formas de perda cognitiva secundária a doença cerebrovascular, estendendo-se de déficit moderado a demência.

As possíveis manifestações clínicas relacionadas ao prejuízo cognitivo vascular incluem a perda da memória, a confusão mental, a disfunção executiva também atinge funções especializadas como linguagem (afasia - perda da capacidade de compreensão e de expressão pela palavra escrita ou pela sinalização, assim como pela fala), apraxia (perda da capacidade de executar movimentos voluntários) ou agnosia (falta de capacidade de captar estímulos recebidos através dos sentidos), entre outros que podem resultar do acidente vascular cerebral (Román, 2005).

De acordo com Rockwood (2002), embora os critérios diagnósticos não estejam inteiramente definidos, a identificação de pacientes com prejuízo cognitivo vascular antes do desenvolvimento de demência, possibilita a intervenção através de tratamentos para modificar o avanço da doença.

Existem evidências crescentes que sugerem o envolvimento do sistema colinérgico na demência vascular (Grantham & Geerts, 2002). A disfunção colinérgica é bem documentada em estudos com modelos animais de demência vascular isquêmica, incluindo ratos espontaneamente hipertensos propensos ao acidente vascular cerebral (spontaneously hypertensive stroke-prone rats- SHspR). Neste modelo experimental, os animais exibem sintomas característicos de pacientes com demência vascular, como o déficit cognitivo e a mudança comportamental e demonstram função colinérgica reduzida em nível central (Saito et

al., 1995). Além disso, Togashi et al (1994) encontraram níveis reduzidos de acetilcolina (ACh) e colina no córtex, hipocampo e líquido cefalorraquidiano de ratos SHspR.

Déficits em marcadores colinérgicos são também encontrados em pacientes com demência vascular, independente da presença concomitante da doença de Alzheimer. Esses consistem na diminuição dos níveis de ACh no líquido cefalorraquidiano, e redução na atividade da ChAT no encéfalo de pacientes com diagnóstico de demência vascular, conforme revisado por Román (2005). Existe uma correlação positiva entre a diminuição nos níveis de ChAT e o número de receptores nicotínicos colinérgicos (nAChR), sugerindo que existe uma degeneração da neurotransmissão colinérgica como um todo (Grantham & Geerts 2002). Ainda tem sido demonstrado que o sistema colinérgico desempenha um papel importante na função cognitiva, especialmente no campo da atenção, memória e emoção, assim como no controle do fluxo sanguíneo cerebral. O prejuízo cognitivo na demência vascular pode aparecer diretamente a partir perda dos neurônios colinérgicos causada pela isquemia (Román & Kalaria, 2005). O sistema colinérgico e o fluxo sanguíneo cerebral mostram-se ligados de forma recíproca, de maneira que, mudanças no fluxo sanguíneo cerebral podem afetar neurônios colinérgicos, enquanto que a função colinérgica sem qualquer distúrbio é necessária para regular o fluxo sanguíneo cerebral (Román & Kalaria, 2005).

O sistema vasodilatador colinérgico atua através da ativação dos receptores colinérgicos nicotínicos e muscarínicos, e considerando que esta resposta decai com a idade, a capacidade de modular o fluxo sanguíneo cerebral está diminuída na população idosa (Román 2005). Assim, a perda da função colinérgica em pacientes com demência vascular está associada com a redução do fluxo sanguíneo cerebral (Román, 2005). As estratégias terapêuticas focam os fatores de risco e a prevenção de futuros acidente vascular isquêmico a fim de evitar o avanço da demência vascular ou para reduzir o risco do desenvolvimento de tal patologia neurodegenerativa. Os inibidores de colinesterases (IChE) são atualmente aprovados para o tratamento da DA e vêm demonstrando efeitos benéficos nos sintomas cognitivos e comportamentais desta demência em triagens clínicas, como revisado por Román & Kalaria (2005).

As evidências sugerindo a ocorrência de uma disfunção colinérgica em pacientes com demência vascular dão suporte aos testes experimentais usando os

mesmos fármacos com o objetivo de aumentar a concentração da ACh pela inibição da enzima acetilcolinesterase sináptica. Na literatura observa-se que este uso tem se mostrado como uma abordagem terapêutica promissora (Lojkowska et al., 2003; Erkinjuntti et al., 2004).

2.7 Sistema colinérgico

A ACh (Figura 10) é o neurotransmissor endógeno das sinapses e junções neuroefetoras colinérgicas dos sistemas nervoso central e periférico. É sintetizada na junção neuroefetora e ganglionar a partir do Acetil CoA, um produto do metabolismo celular, e da colina, um importante produto do metabolismo dos lipídeos da dieta, pela ação da enzima colina acetiltransferase (ChAT; EC 2.3.1.6) (Soreq & Seidman, 2001; Prado et al., 2002). A colina pode ser transportada pelo sangue sob a forma de fosfolípido do fígado para as células nervosas sendo liberada pela fosfolipase. A colina é então captada nos terminais nervosos colinérgicos por um sistema de alta afinidade dependente de Na^{2+} . Outra fonte de colina é a hidrólise da própria ACh, liberada na fenda sináptica, da qual 35-50 % poderá ser reutilizada (Parsons et al., 1993).

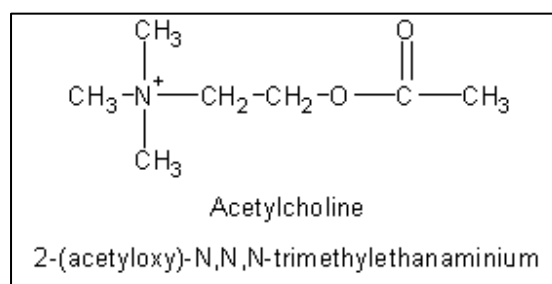


Figura 10- Estrutura química do neurotransmissor acetilcolina
([http:// www.facultystaff.vwc.edu/acetylcholine.gif](http://www.facultystaff.vwc.edu/acetylcholine.gif))

A síntese da ACh é finamente regulada e, esta é acondicionada em vesículas que protegem o neurotransmissor da hidrólise pela ação de colinesterases intracelulares. Dois principais mecanismos contribuem na regulação dos níveis de

ACh nas células: inibição da ChAT por retroalimentação induzida por ACh e pela disponibilidade dos seus precursores, Acetil CoA e colina (Prado et al., 2002).

A propagação do potencial de ação no terminal nervoso desencadeia a liberação do neurotransmissor por exocitose num mecanismo Ca^{2+} -dependente (Prado et al., 2002). A ACh é amplamente distribuída no SNC, onde seus efeitos são principalmente excitatórios, efetivados pela ativação de receptores específicos, designados como receptores colinérgicos e, subdivididos em dois grandes grupos: nicotínicos e muscarínicos, que transmitem os sinais por mecanismos diferentes (Rang et al., 2004).

Os receptores muscarínicos estão em sua maioria acoplados à proteína G e promovem a ativação de canais iônicos e uma variedade de segundos mensageiros, resultando na despolarização ou hiperpolarização dependendo do tipo de canal que estiver associado a este receptor. Muitos dos efeitos comportamentais associados às vias colinérgicas parecem ser produzidos pela ação da ACh sobre estes receptores (Soreq & Seidman, 2001; Rang et al., 2004). Os receptores nicotínicos são compostos por cinco subunidades designadas: α , β , γ e δ . As subunidades α são expressas em duas formas α_1 e α_2 , e são necessárias duas moléculas de ACh para estimular o receptor, que ao se ligarem produzem mudanças conformacionais permitindo a entrada de cátions. Esses receptores atuam também ao facilitar a liberação de outros transmissores, como a dopamina (Ungless & Cragg, 2006).

Após exercer sua ação, a ACh sofre hidrólise pelas colinesterases com a liberação de ácido acético e colina; esta é, em parte recaptada para o terminal pré-sináptico, através de um mecanismo de recaptação de alta afinidade (Soreq & Seidman, 2001).

2.7.1 Colinesterases

As colinesterases são enzimas que desempenham papéis importantes na neurotransmissão colinérgica central e periférica, além de funções como a hidrólise e detoxificação de xenobióticos (Klaassen et al., 1996). Estas enzimas mostram um polimorfismo das estruturas quaternárias, de atividade catalítica similar, mas diferindo nos seus parâmetros hidrodinâmicos e nas interações iônicas ou

hidrofóbicas (Taylor & Radic, 1994). Estas são classificadas de acordo com as suas propriedades catalíticas e especificidade a substratos, sensibilidade a inibidores e distribuição tecidual (Massoulié et al., 1993). A acetilcolinesterase (AChE; EC 3.1.1.7) hidrolisa preferencialmente ésteres com grupamento acetil (como a acetilcolina) e a butirilcolinesterase ou pseudocolinesterase (BuChE; EC 3.1.1.8) hidrolisa, preferencialmente, outros tipos de ésteres como a butirilcolina. Ambas as colinesterases são distribuídas amplamente por todo o corpo (Taylor & Brown, 1999).

A concentração do substrato pode influenciar a atividade enzimática, dependendo da colinesterase considerada, uma vez que a AChE inibida por excesso de substrato enquanto a BuChE não apresenta tal efeito (Nunes-Tavares et al., 2002).

Apesar da função fisiológica da BuChE não estar totalmente elucidada, sabe-se que esta enzima hidrolisa uma variedade de xenobióticos como aspirina, succinilcolina, heroína e cocaína (Klaassen et al., 1996).

2.7.2 Acetilcolinesterase (EC 3.1.1.7; AChE)

A AChE é uma enzima regulatória importante que controla a transmissão do impulso nervoso através da sinapse colinérgica pela hidrólise e inativação da ACh (Appleyard, 1992; Soreq & Seidman, 2001) modulando a concentração deste transmissor na sinapse. O término da ação é normalmente dependente da dissociação da acetilcolina do receptor e sua subsequente difusão e hidrólise, exceto em doenças em que os níveis de ACh são limitados ou sob inibição da AChE (Soreq & Seidman, 2001). As mudanças nos níveis e propriedades da AChE estão associadas com respostas a inúmeros estímulos externos (Soreq & Seidman, 2001).

A AChE é uma das enzimas de maior eficiência catalítica que se conhece, com a capacidade de hidrolisar até 6×10^5 moléculas de ACh por molécula de enzima por minuto, o que significa um tempo de renovação de 150 microsegundos (Silman & Sussman, 2005).

No entanto, o papel biológico da AChE não está limitado a transmissão colinérgica, já que essa proteína é encontrada em níveis elevados em outros

tecidos. Uma evidência adicional para o papel não-colinérgico dessa proteína, foi a comparação dos níveis de AChE e ChAT em neurônios não-colinérgicos que continham somente AChE (Appleyard, 1992).

Atualmente, existe o interesse no meio científico pelo papel não-catalítico dessa proteína, e alguns trabalhos têm demonstrado que variantes estruturais da AChE estão amplamente distribuídas pelos tecidos humanos participando de funções no crescimento e adesão celular, neurogênese, sinaptogênese, hematopoiese, osteogênese; além de processos patológicos associados ao estresse e deterioração de neurônios colinérgicos (Soreq & Seidman, 2001; Bartolini et al., 2002).

2.7.3 Estrutura da AChE

A AChE existe como duas classes gerais de formas moleculares: oligômeros homoméricos simples de subunidades catalíticas e associações heteroméricas de subunidades catalíticas com subunidades estruturais (Figura 11) (Massoulié et al., 1993; Taylor & Radic, 1994).

Uma classe de formas moleculares apresenta-se como uma montagem homomérica de subunidades catalíticas que aparecem como monômeros, dímeros ou tetrâmeros dando origem às formas globulares (G): G₁, G₂ e G₄. Essas também diferem quanto ao grau de hidrofobicidade e suas características anfífilas, conseqüentes à adição pós-transducional de um glicofosfolípídeo no aminoácido carboxi-terminal (Taylor & Brown, 1999).

As formas homoméricas são encontradas como espécies solúveis na célula, presumivelmente com o intuito de exportação ou associadas à membrana externa da célula por meio de uma seqüência de aminoácidos hidrofóbicos intrínsecos ou do glicofosfolípídeo acoplado (Taylor & Brown, 1999). A forma globular solúvel da enzima também foi identificada no cérebro. Em certos neurônios dopaminérgicos, a AChE na forma solúvel é co-liberada com a dopamina durante estimulação nervosa; no entanto o motivo da sua liberação não é conhecido (Taylor & Brown, 1999).

A outra classe de AChE se apresenta como uma montagem heteromérica das subunidades estrutural e catalítica, onde a ligação através de pontes dissulfeto de

uma molécula tríplice helicoidal de colágeno a um, dois ou três tetrâmeros catalíticos resulta nas formas estruturais assimétricas A_4 , A_8 e A_{12} (Massoulié et al., 1993). As formas assimétricas são encontradas associadas com a lâmina basal externa na sinapse e são particularmente abundantes nas áreas juncionais da musculatura esquelética (Taylor & Brown, 1999). Essas formas são freqüentemente denominadas assimétricas, uma vez que a subunidade de “cauda” confere uma considerável assimetria dimensional à molécula. As diferenças nos arranjos das subunidades levam a uma localização distinta da AChE sobre a superfície da célula, mas parece não afetar as atividades catalíticas intrínsecas das formas individuais (Massoulié et al., 1996). A maior parte da AChE encontrada no tecido nervoso é do tipo globular, principalmente G_4 , ligada a membrana (Massoulié et al., 1993). A forma A_{12} da enzima é principalmente encontrada na junção neuromuscular de muitos mamíferos, embora esta não seja específica da placa motora terminal (Aldunate et al., 2004).

O padrão de formas moleculares para as células sanguíneas mostra que tanto os eritrócitos, linfócitos como as plaquetas contêm a forma globular dimérica (G_2), tetramérica (G_4) a assimétrica (A_{12}). Entretanto, nenhuma forma globular monomérica (G_1) foi encontrada nas células sanguíneas humanas (Rakonezay et al., 2005). Os eritrócitos mostram um predomínio da forma globular dimérica (G_2), encontrada em até 98% das células como foi demonstrado por Rakonezay et al. (2005). Em ambos, linfócitos e plaquetas, a principal forma encontrada é a G_2 (aproximadamente 80%) e as formas G_4 e A_{12} mostram-se igualmente distribuídas.

As funções fisiológicas da AChE eritrocitária ainda não são bem estabelecidas. Estudos vêm sendo realizados a fim de determinar se alterações na atividade da AChE sangüínea podem ser usadas para predizer alterações na atividade da enzima cerebral ou efeitos comportamentais (Nigg & Knaak, 2000), uma vez que a AChE eritrocitária apresenta estrutura e propriedades mecánísticas similar àquela da sinapse neuronal (Thierman et al., 1997).

Padilha et al. (1996, apud Nigg & Knaak, 2000) demonstraram que a inibição da AChE sangüínea pelo clorpirifós foi um bom indicador da inibição da enzima cerebral e de mudanças na atividade motora. Worek et al. (2004) investigaram a interação entre a AChE sangüínea, oximas e uma variedade de agentes nervosos e organofosforados. O estudo determinou a base cinética para a avaliação da eficiência das oximas e para estimar as concentrações efetivas destes reativadores da inibição da AChE sangüínea em humanos.

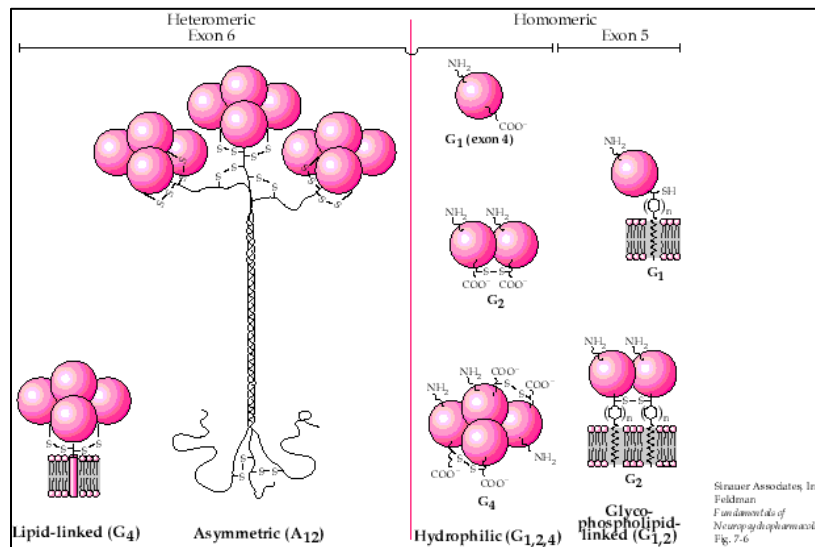


Figura 11- Isoformas da enzima AChE (http://www.chemistry.emory.edu/ach_inactivation.htm)

2.7.4 Mecanismo catalítico

As propriedades bioquímicas e a importância fisiológica da AChE fizeram desta enzima um alvo interessante para a análise detalhada da sua função estrutural. A codificação da seqüência de aminoácidos da AChE foi clonada, abrangendo progressivamente diversas espécies de invertebrados e vertebrados incluindo vários mamíferos, entre eles o homem. A seqüência de dados foi seguida pelo primeiro modelo de estrutura cristalina da AChE dimérica de *Torpedo Califórnia*, a qual vem sendo historicamente uma das principais fontes da enzima colinérgica para a pesquisa. Mais tarde, a estrutura cristalina da AChE a partir de outras fontes, incluindo o homem foi obtida e mostraram-se essencialmente semelhantes (Soreq & Seidman, 2001).

A estrutura tridimensional da AChE demonstra que o sítio ativo é quase centroassimétrico a cada unidade e reside na base de um gargalo estreito com uma profundidade de 20 Å (Sussman et al., 1991). A enzima é classificada como uma serina hidrolase. Na base do gargalo situam-se os resíduos da tríade catalítica: Ser-203, His-447 e Glu-334. O mecanismo catalítico assemelha-se ao de outras

hidrolases, onde o grupamento hidroxila da serina torna-se altamente nucleofílico por um sistema de reposição de carga que envolve o grupamento carboxila do glutamato, o imidazol da histidina e a hidroxila da serina (Taylor, 1996). Durante o ataque enzimático sobre o éster, é formado um intermediário tetraédrico entre a enzima e o éster que se rompe e forma um conjugado acil-enzima com a liberação concomitante da colina (Figura 12).

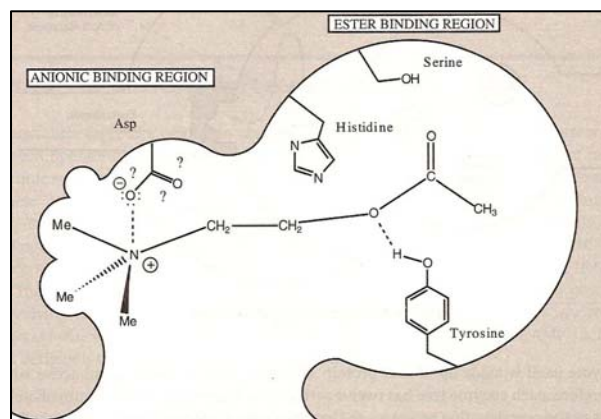


Figura 12- Interação do substrato (ACh) com o sítio esterásico da AChE (adaptado de Patrick, 2001)

A acetil enzima é passível de hidrólise e essa resulta na formação do acetato e na regeneração da enzima ativa (Figura 13) (Soreq & Seidman, 2001).

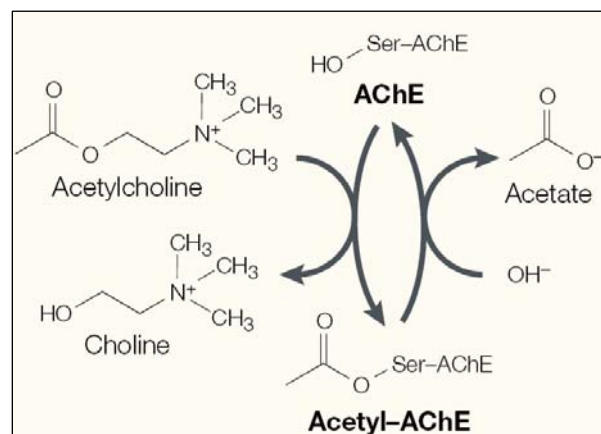


Figura 13- Hidrólise da ACh pela enzima AChE (adaptado de Soreq & Seidman, 2001).

A visão tradicional do sítio ativo da AChE foi considerada como tendo dois subsítios; um sítio carregado negativamente ou “aniônico” ao qual a cadeia de nitrogênio quaternário $[-N+(CH_3)_3]$ da acetilcolina carregada positivamente se liga, e um sítio esterásico contendo os verdadeiros resíduos catalíticos, que aloja o grupamento éster e carbonila da ACh (Figura 14) (Taylor & Brown, 1999). Um segundo sítio “aniônico” que se tornou conhecido como sítio aniônico periférico (peripheral anionic site - PAS) foi proposto com base na ligação de compostos bis quaternários. Sugere-se que este sítio periférico possa estar envolvido na ação de determinados inibidores da enzima ou na inibição por excesso de substrato (Nunes-Tavares et al., 2002; Silman & Sussman, 2005). A ocupação do sítio periférico afeta a conformação do centro ativo e também a configuração ou a afinidade dos compostos ligados ao centro ativo.

Estudos a partir de mutagênese dirigidas a sítios específicos têm descrito muitas das características da ligação da acetilcolina à enzima AChE, principalmente em relação ao sítio periférico, que parece ser fundamental para algumas das funções não-clássicas da enzima (Soreq & Seidman, 2001).

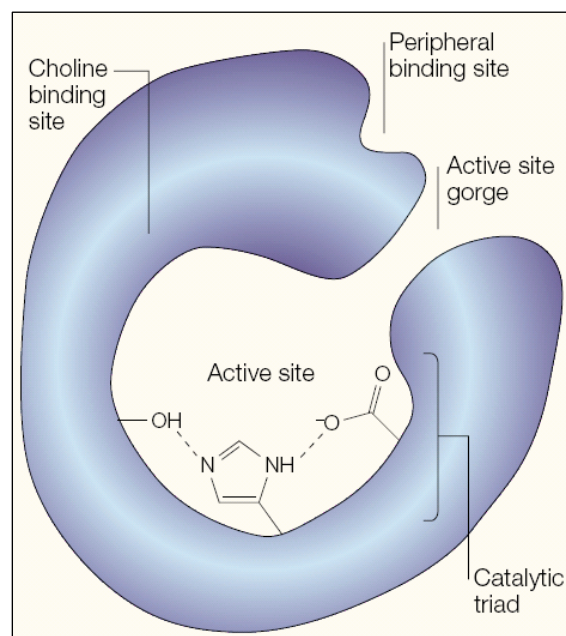


Figura 14- Sítio esterásico contendo a tríade catalítica, externamente o sítio periférico aniônico (PAS) (adaptado de Soreq & Seidman, 2001)

2.7.5 Sistema colinérgico *versus* endotélio

Um fato bem documentado é o de que a ACh atua como mediador de efeitos no endotélio vascular, como por exemplo na geração do fator de relaxamento derivado do endotélio. Kirkpatrick et al. (2001) com base em experimentos com células endoteliais em cultura de tecido, demonstraram a existência de elementos essenciais do sistema colinérgico: ChAT, ACh e VAChT (vesícula transportadora de acetilcolina) no endotélio humano. A capacidade de o endotélio responder a ACh depende da expressão dos receptores colinérgicos (AChR), os quais podem ser muscarínicos (mAChR) ou nicotínicos (nAChR). O trabalho pioneiro de Furchgott & Zawadzki (1980, apud Kirkpatrick et al., 2001) demonstrou que a interação da ACh com o mAChR leva a produção de um vasodilatador pelo endotélio, atualmente aceito como óxido nítrico. A liberação da ACh a partir das células endoteliais pode ter efeito protetor contra a hipóxia, através da atividade vasodilatadora da ACh, conforme sugerido por Parnavelas et al. (1985, apud Kirkpatrick et al., 2001).

3. MANUSCRITOS

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de manuscritos, os quais se encontram aqui organizados. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se nos próprios manuscritos. As apresentações estão baseadas na versão submetida à publicação na revista *European Journal of Neurology* (Manuscrito 1) e na versão em fase final de revisão pelos autores para submissão à revista *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* (Manuscrito 2).

3.1 OXIDATIVE STRESS IN HYPERTENSIVE PATIENTS AND IN ISCHEMIC PATIENTS OF BOTH ACUTE AND CHRONIC STAGES

3.2 ACTIVITY OF AChE IN WHOLE BLOOD FROM PATIENTES DIAGNOSED FOR ACUTE AND CHRONIC STAGE OF ISCHEMIA

**OXIDATIVE STRESS IN HYPERTENSIVE PATIENTS AND IN ISCHEMIC
PATIENTS OF BOTH ACUTE AND CHRONIC STAGES**

**Maísa de Carvalho Corrêa, Paula Maldonado, Cíntia Saydelles da Rosa,
Rosilene Rodrigues Kaizer, Gilberto Lunkes, Daniele Sausen Lunkes, Maria
Ester Pereira, Vera Maria Morsch, Maria Rosa Schetinger***

**Departamento de Química, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica
Toxicológica, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de
Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.**

Stroke Ischemic and Oxidative Stress

Keywords

Acute Isquemia; Catalase; Chronic Stroke; Hypertension; Lipid peroxidation; Protein carbonyl; Reduced glutathione

***Corresponding author: Fax: +55 (55) 32208978**

e-mail address: mariaschetinger@gmail.com and pereirame@yahoo.com.br

Abstract

Ischemic stroke is a leading cause of mortality and disability particularly in the elderly. We investigated changes in oxidative status in patients diagnosed with the acute and chronic stage of ischemia as well as hypertension. We determined the catalase activity in blood, reduced glutathione (GSH) in erythrocytes, TBARS and protein carbonyl content from serum samples of the patients. The oxidative profile of lipids and proteins represented by MDA content and protein carbonylation, respectively, showed increased levels in the acute phase of ischemic stroke as well as in the hypertensive group, when compared to the control. Catalase activity and GSH levels in acute patients also were higher than in the hypertensive and control groups. No difference was found in the catalase activity in patients from the chronic stage of stroke and hypertensive groups ($p < 0.05$). The results suggest increased antioxidant defense as a compensatory mechanism in consequence of the overproduction of reactive oxygen species (ROS) after acute stroke. We also demonstrated that hypertension itself, acts like a prevalent risk factor of stroke, contributing to oxidative cellular damage.

Abbreviations

ATP, adenosine triphosphate; CAT, catalase; CNS, central nervous system; CT, Computed Tomography; DM, diabete melittus; GSH, reduced glutathione; GSHPx, glutathione peroxidase; HT, hypertension; MDA, malondialdehyde; ROS, reactive oxygen species; SOD, superoxide dismutase.

1. Introduction

The central nervous system (CNS) has a high rate of oxygen metabolism and, because of its strict aerobic glucose metabolism, is totally dependent on an adequate arterial blood flow (1). If this flow is disrupted for even a short period of time the result is cell damage or death (2). There are many causes for this disruption and these are collectively referred to as stroke (3). Stroke has been classified as hemorrhagic or ischemic form based on the pathology of the underlying focal brain injury (3). The latter form is one of leading causes of death worldwide, representing a huge public health concern (4). The damage is caused by a reduction or complete blockage of blood flow to parts of the brain tissue (1).

Risk factors for ischemic strokes are multiple and combined: age, hypertension (HT), cigarette smoking, atrial fibrillation, hyperlipidemia and diabetes mellitus (DM) (4). In recent years, the identification of molecules contributing to neuronal death, particularly apoptosis, has thrown light on the pathogenesis of brain damage after ischemic stroke (1, 5). Oxidative stress is believed to be one of the mechanisms taking part in neuronal damage in stroke (6). This situation results from an imbalance between the free radicals production, in particular reactive oxygen species (ROS), and the ability of the organism to defend against them, leading to progressive damage (5). These species lead to the oxidative damage of cellular macromolecules, such as lipids, proteins and nucleic acids (7).

During cerebral ischemia, a number of events predispose the brain to form ROS, such as decrease in adenosine triphosphate (ATP) levels, loss of Ca^{2+} homeostasis, excitotoxicity, alteration of arachidonic acid metabolism, mitochondrial dysfunction, acidosis and edema (1,8). In the course of reperfusion, events associated with the blood reflow also result in an overproduction of ROS (6). Thus,

the antioxidant enzymatic activity of the tissue, affected by ischemia-reperfusion, is particularly important as the primary endogenous defense against free radicals induced injury (9).

Some biological substances that might be potential peripheral markers in stroke have been investigated, since it is difficult to directly measure free radical and oxidized molecules in the human brain (10). Significant increases in lipoperoxidation products or decreases of some antioxidants in plasma have been reported in stroke patients, and the presence of oxidative stress in stroke has been judged by these indices (5). One of the well known lipoperoxidation products is malondialdehyde (MDA) (5). In several studies, higher serum MDA levels were shown in acute stroke patients (11-13).

Proteins are considered to be the most susceptible target for oxidative modification. Because of the role of such molecules as enzymatic catalysts, their damage may impair their activity (14). Free radicals induce damage to the susceptible side chain of amino acids, which leads to the creation of aldehyde or keto residues, defined as CO products (15). Protein carbonyl content is currently the most general indicator and commonly used marker of protein oxidation (16).

A sensitive balance between the generation and neutralization of oxidants by different intra and extracellular defense mechanisms helps to protect vital cell components (17-18). Circulating scavenging antioxidants with a high redox potential, such as reduced glutathione (GSH) as well as intracellular antioxidant enzymes, such as glutathione peroxidase (GSHPx), superoxide dismutase (SOD) and catalase maintain this equilibrium (19). The antioxidant activity of plasma and erythrocytes may be an important factor providing protection against neurological damage caused by stroke-associated oxidative stress (20).

According to Casado and colleagues (21) in an early publication, catalase activity was increased in the acute phase of stroke and there was also a relationship found between the activity of this antioxidant enzyme and the degree of neurological deficit.

Therefore, our study aimed to verify lipid peroxidation, using the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) content determination; protein oxidative profile, using protein carbonyl assay; and antioxidant defense, using catalase and reduced glutathione levels as parameters. The study was carried out with patients who had been diagnosed with cerebrovascular ischemic accident, both acute and chronic, as well as another group composed of hypertensive subjects. It is important to note that we judged the combined analysis of the groups mentioned above to be essential, as hypertension is the most important risk factor in strokes, being that it is present in 70% of all the strokes.

Patient and Methods

Patient selection

The chronic stroke group was constituted of 18 out-patients from the Neurology Out-patient Center of the Federal University of Santa Maria Hospital with a history of stroke of more than six months earlier and that presented mainly motor damage.

The acute group consisted of 9 patients with clinical symptoms of ischemia, admitted to the emergency room of the above mentioned hospital within a few hours after the onset of neurological deficit. On admission, all patients underwent full physical and neurological examinations. The Computed Tomography (CT) scan of

the brain was performed to exclude the possibility of intracranial hemorrhage. Blood samples were taken up to seven days after the diagnosis.

Vascular risk factors, including hypertension, diabetes and smoking habits were recorded for each patient. Some of the individuals in the acute and convalescent phase of ischemic stroke were also using antihypertensive drugs, and/or insulin, and/or statins.

The third group was composed of 18 hypertensive subjects, selected from the Assistance Program for Hypertensive Patients, who had been previously diagnosed with moderate hypertension and were using antihypertensive drugs. The patients included in this study were of both sexes and with similar ages.

The control group included 20 healthy individuals (age range 38-60 years) that were of similar ages. None of the subjects in the control group were taking any pharmacological therapy or were suffering from any inflammatory process or malignant disease. The study was approved by the Human Ethical Committee of the Federal University of Santa Maria, protocol number 96/05, Brazil. All the participants signed free consent before the blood was collected. The patient's general characteristics are shown on Table 1.

Sample collection

The blood was collected in vacountainer tubes without anticoagulant system, centrifuged at 5000 rpm for 10 min, the precipitated was discarded and the serum was used to make the TBARS and the protein carbonyl analysis. For the catalase activity, the blood was collected in citrated vacountainer tubes and the total blood was diluted 1:10 in saline solution to make the determination. For reduced glutathione determination, we collected the blood using EDTA as anticoagulant, the

sample was centrifuged (5.000 rpm for 10 min) and the erythrocytes were used to execute the determination.

Determination of Lipid peroxidation

The lipid peroxidation was estimated by the measurement of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in serum samples by modifications of the method of Jentzsch et al. (22). In short, 0.2 mL of serum was added to the reaction mixture containing 1 mL of 1% orto-phosphoric acid, 0.25 mL alkaline solution of thiobarbituric acid –TBA (0.1 mol/L) (final volume 2.0 mL) followed by 45 min heating at 95°C.

After cooling, samples and standards of malondialdehyde were read at 532 nm against the blank of the standard curve. The results were expressed as nmol MDA/mL. The biochemical data are expressed as mean \pm SD.

Carbonilation of serum protein

The carbonylation of serum proteins was determined by modifications of the Levine's method (23). Firstly, from 1 mL of serum, the proteins were precipitated using 0.5 mL of 10% trichloroacetic acid (TCA) and centrifuged at 5000 rpm for 5 min discarding the supernatant. One half milliliter of 10 mmol/L 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) in 2 mol/L HCl was added to this precipitated protein and incubated at room temperature for 30 min. During the incubation time the samples were mixed vigorously every 15 min. After the incubation time, one half milliliter of 10 % TCA was added to the protein precipitated and centrifuged at 5000 rpm for 5 min. After discarding the supernatant, precipitates were washed twice with 1 mL of ethanol/ethylacetate (1:1), each time centrifuging out the supernatant in order to

remove the free DNPH. The precipitate was dissolved in 1.5 mL of protein dissolving solution (2g SDS and 50 mg EDTA in 100 mL 80 mmol/L phosphate buffer, pH 8.0) and incubated at 37°C water bath for 10 min. The color intensity of the supernatant was measured using spectrophotometer at 370 nm against 2 mol/L HCl. Carbonyl content was calculated by using molar extinction coefficient ($21 \times 10^3 / \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$) and results were expressed as nmol/mg protein.

Catalase activity

The determination of catalase activity was done by modifications in the method of Nelson and Kiesow (1972) (24). This assay involves the change in absorbance at 240 nm due to the catalase dependent decomposition of hydrogen peroxide (H_2O_2). Aliquot (0.02 mL) of blood was homogenized in potassium phosphate buffer, pH 7.0. The spectrophotometric determination was started by the addition of 0.07 mL of aqueous solution of hydrogen peroxide 0.3 M. The change in absorbance at 240 nm was measured for 2 min. The catalase activity was calculated using molar extinction coefficient ($0,0436 \text{ cm}^2 / \mu\text{mole}$) and the results were expressed as $\mu\text{moles/mg protein}$.

Reduced glutathione levels

GSH was determined by the method of Ellman (1959) (25) in erythrocytes (0.3 mL) hemolyzed by 10% Triton X-100 (0.1 mL) and, after 10 min, precipitated with 0.2 mL of 20% TCA. After centrifugation at 5,000 rpm for 10 min, the supernatant aliquots were reacted to 50 μL of 10 mM of 5-5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) and the reaction product was read at 412 nm. The curve was done to

calculate the factor using cystein as standard. GSH content was expressed as $\mu\text{mol/mL}$ of erythrocyte.

Protein determination

Protein was determined by the method of Bradford (1976) (26) using bovine serum albumin as standart.

Statistics

The results comparisons were analyzed by one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test. Effects were considered significant when $p < 0.05$.

Results

Lipid peroxidation

The hypertensive group demonstrated increased MDA content when compared to the control, however, it was statistically lower when compared with acute or chronic ischemia groups ($p < 0.05$) (Figure 1). No significant difference was found between the acute and chronic patients.

Protein Carbonyl content

Protein oxidation, determined by protein carbonyl content in serum samples, is shown in Figure 2. The hypertensive group presented increased protein carbonyl content when compared to the control and chronic ischemic groups, in spite of the fact that the majority of the subjects in the chronic stage had been hypertensive beforehand. Patients diagnosed with acute stroke showed higher levels of oxidatively modified proteins than the control, hypertensive or chronic ischemia groups ($p < 0.05$)

Antioxidant Catalase Activity

The catalase activity in acute ischemia was increased when compared to the control, hypertensive and chronic stroke patients ($p < 0.05$). No significant difference was observed between the hypertensive and chronic patients and the other two groups (Figure 3).

Levels of Reduced Glutathione (GSH)

Patients in the acute and chronic groups showed GSH levels higher than the control and hypertensive groups ($p < 0.05$) (Figure 4).

Discussion

The brain is vulnerable to oxidative stress due to its high amount of polysaturated fatty acids, low repair mechanism capacity and non-replicating nature of its neuronal cells. It has been demonstrated that almost 2-5% of the electron flow of the respiratory chain in isolated brain mitochondria produces superoxide anion and hydrogen peroxide (H_2O_2) (2). It is assumed that oxidative stress contributes to the initiation and development of stroke through different mechanisms: excitotoxicity, resulting in cellular enzyme activation and ROS generation (5).

Critical ischemia leads to the production free radicals at high concentrations, exceeding the antioxidant capacity of the human body, which in turn leads to the death of ischemic tissues (27). ROS may contribute to brain injury by directly attacking macromolecules, including proteins, lipids and DNA or indirectly by affecting cellular signaling pathways and genes (28).

Lipid damage induces the phenomenon known as lipoperoxidation, which culminates in MDA formation. There are several studies demonstrating high serum MDA levels in the acute phase of stroke (11-13), but there are only a few studies addressing the level of lipoperoxidation products in the chronic stage of stroke with conflicting results (29, 30).

Prevalent risk factors of stroke contribute to oxidative cellular and tissue damage (5). Since there is a close relation between lipoperoxidation products and HT, DM, dyslipidemia and atherosclerosis, which are frequently present in stroke patients, high serum MDA levels detected in these individuals could be present regardless of stroke (31).

Our results showed increased MDA levels in the hypertensive group, demonstrating that hypertension in and of itself was responsible for this increase. However, patients during acute stroke and the convalescent (chronic) stage of ischemia revealed higher MDA levels than those for the hypertensive group and control subjects. Thus, we demonstrated that ischemia itself may be responsible for causing elevated serum MDA levels as well as hypertension and that this increase may not be caused only by hypertension as the greater risk factor for this disease. Our findings in the chronic phase of stroke are in accordance with the study of Alexandrova et al. (2003) (30), and we agree with the interpretations of the authors when they say that the observed contradiction might be a result of stroke heterogeneity, risk factors and methodology used in the studies.

Proteins are possibly the most immediate vehicle for inflicting oxidative damage on cells. The importance of the oxidative modification of proteins and the formation of carbonyl groups in their side chains of amino acids has been widely studied during the last few years (15). The formation of protein carbonyl seems to be

a common phenomenon during oxidation, and their quantification may be used to measure the extent of oxidative damage (16). Oxidatively modified proteins are chemically stable products, a fact that is very important for their detection and for storage of the samples (16).

Our findings confirm results from the literature indicating that ischemia has a significant influence on the process of oxidative damage to proteins (32). Our study revealed significant increased protein carbonyl content both in hypertensive and acute ischemic group and this latter presented higher level of the protein oxidation than the hypertensive patients.

According to Chang and colleagues (33), no significant difference in protein carbonylation concentration was found in ischemic stroke patients 24 hours before and after the clinical event. Differently from these authors (33), we verified an increased protein carbonylation content in the acute event. Unexpected lower protein carbonyl content was found in patients in the convalescent (chronic) stage when compared to the hypertensive group.

Circulating scavenging antioxidants with a high redox potential, as well as intracellular antioxidant enzymes, are part of the protection mechanisms that overcome oxidative stress (17). The role of endogenous defense mechanisms, including antioxidant enzymes in stroke, is controversial (34). On the other hand, the amount of oxidative stress and the acute changes of the antioxidant capacity may influence the prognosis of cerebral ischemia (35). Enhanced antioxidant capacity after acute stroke, therefore, may protect against the adverse effects of free radical production during ischemia and reperfusion (36).

According to Alexandrova et al. (37), blood antioxidant defense was altered in stroke patients, where an increased activity of two enzymes, catalase (CAT) and

glutathione peroxidase (GSHPx), was registered during the entire acute phase of stroke, regardless of its severity. The results also showed that patients who had taken antihypertensive drugs for a long time had a lower catalase activity level.

Our results are in accordance with the study cited above, showing an increased activity of catalase in the blood in the acute phase of the pathology. We agree that catalase plays an important role in the acquisition of tolerance to oxidative stress in the adaptive response of cells (38). Hypertensive patients and those in the chronic stage of stroke showed that catalase activity remained unchanged in comparison with the control group. We consider that the established increase in catalase activity in the acute clinical event probably is not due to the use of antihypertensive drugs, since their effect is an opposite one. Moreover, patients both in the hypertensive and chronic groups make use of similar drugs, but demonstrate primary endogenous defense against oxygen free radicals.

GSH is a free radical scavenger and a proton donor for GSHPx and known to play a neuroprotective role (39). Reduced GSH levels have been found in a number of neurodegenerative diseases with states of oxidative stress, as well as in the process of normal aging (39). Zimmermann et al. (17) showed elevated GSH levels during the first hours after acute stroke, and also reported that more than half of the age-and-risk-matched patients with a history of stroke in the 12 months previous to the study showed GSH levels below the normal range. Our study revealed increased GSH levels in acute and chronic ischemic groups when compared to hypertensive patients, who showed significantly lower GSH levels than ischemic subjects. These results demonstrated that even after an ischemic event the organism increases the GSH levels as a tentative of antioxidant defense.

In conclusion, the oxidative profile of lipids and proteins, represented by MDA content and protein carbonylation, respectively, were increased in both the acute ischemic stroke and in the hypertensive group when compared to the controls.

This study suggests that in the acute phase, free radicals and ROS are directly involved in biological cell damage. However, the high serum MDA levels detected in patients with chronic stroke is probably independent of the CNS lesions, and could be related with risk factors of stroke itself, as was demonstrated by the hypertensive group results.

Antioxidant defense, estimated by catalase activity and GSH levels, demonstrated a significant increase in acute ischemic patients. We believe that these plasmatic and erythrocyte antioxidant changes play a role as neuroprotective agents in stroke, since there is evidence supporting the occurrence of oxidative stress during ischemia.

The elevated GSH levels in the convalescent stage of stroke may have marked protective effects against oxidative damage by means of its direct antioxidant effects. Thus, our study demonstrated a compensatory mechanism in acute and chronic ischemic stroke patients.

Finally, we demonstrated that hypertension acts as a prevalent risk factor of stroke, contributing to oxidative cellular damage.

The most important relevance of this study was in that it included patients of both acute and convalescent stages of ischemic stroke, revealing the oxidative profile in different phases of cerebrovascular accident and the influence of the major risk factor, hypertension, in this pathology.

Acknowledgements

The authors wish to thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

References

1. Moro MA, Almeida A, Bolaños JP, Lizasoain I. Mitochondrial respiratory chain and free radical generation in stroke. *Free Radical Biology & Medicine* 2005; 39: 1291-1304.
2. Halliwell B. Reactive oxygen species and the central nervous system. *Journal of Neurochemistry* 1992; 59: 1609-1623
3. Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends in Neurosciences* 1999; 22: 391-397.
4. Cubrilo-Turek, M. Stroke risk factors: recent evidence and new aspects. *International Congress Series* 2004; 1262: 466-469.
5. Alexandrova ML, Bochev PG. Oxidative stress during the chronic phase of stroke. *Free Radical Biology & Medicine* 2005; 39: 297-316.
6. Macdonald RL, Stoodley M. Pathophysiology of cerebral ischemia. *Neurologia medico-chirurgica* 1998; 38: 1-11.

7. Sugawara T, Noshita N, Lewen A, Gasche Y, Ferrand-Drake M, Fujimura M, Morita-Fujimura Y, Chan PH. Overexpression of copper-zinc superoxide dismutase in transgenic rats protects vulnerable nervous against ischemic damage by blocking the mitochondrial pathway of caspase activation. *The Journal of Neuroscience* 2002; 22: 209-217.
8. Cao W, Carney JM, Duchon A, Floyd RA, Chevion M. Oxygen free radical involvement in ischemia and reperfusion injury to brain. *Neuroscience Letters* 1988; 88: 233-238.
9. Homi H M, Freitas JJS, Curi R, Velasco IT, Junior BAS. Changes in superoxide dismutase and catalase activities of rat brain regions during early global transient ischemia/reperfusion. *Neuroscience Letters* 2002; 333: 37-40.
10. Cherubini A, Ruggiero C, Polidori C, Mecocci P. Potential markers of oxidative stress in stroke. *Free Radical Biology & Medicine* 2005; 39: 841-852.
11. Demirkaya S, Topçuoğlu MA, Aydim A, Ulas UH, Isimer AL, Vural O. Malondialdehyde, glutathione peroxidase and superoxide dismutase in peripheral blood erythrocytes of patients with acute cerebral ischemia. *European Journal of Neurology* 2001; 8: 43-51.
12. Bolokadze N, Lobjanidze I, Momtselize N, Solomonias R, Shakarishvili R, McHedlishvili G. Blood rheological properties and lipidperoxidation in cerebral and

systemic circulation of neurocritical patients. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* 2004; 30: 99-105.

13. Polidori MC, Cherubini A, Stahl W, Senin U, Seis H, Mecocci P. Plasma carotenoid and malondialdehyde levels in ischemic stroke patients: relationship to early outcome. *Free Radical Research* 2002; 36: 265-268.

14. Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *The Biochemical Journal* 1997; 324: 1-18.

15. Jiménez I, Lissi E, Speisky H. Free radical- induced inactivation of lysozyme and carbonyl residue generation in protein are not necessarily associated. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2000; 38: 247-252.

16. Donne ID, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta* 2003; 329: 23-38.

17. Zimmermann C, Winnefeld K, Streck S, Roskos M, Haberl RL. Antioxidant status in Acute Stroke Patients and Patients at stroke Risk. *European Neurology* 2004; 51: 157-161.

18. Lapenna D, Gioia S, Ciofani G et al. Antioxidant properties of ticlopine on human low density lipoprotein oxidation. *FEBS Letters* 1998; 436: 357-360.

19. Michiels C, Raes M, Toussaint O, Remacle J. Importance of Se-gluthatione peroxidase, catalase and Cu/Zn –SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine* 1994; 17: 235-248.
20. Leinonen JS, Ahonen JP, Lonrot K, Lehtonen M, Dastidar P, Molnar G, Alho H. Low plasma antioxidant activity is associated with high lesion volume and neurological impairment in stroke. *Stroke* 2000; 31: 33-39.
21. Casado A, De la Torre R, López-Fernandes ME, Gil P, Egidio JÁ. Enzimas em el infarto cerebral agudo. *Neurologia* 2004; 19: 5-9.
22. Jentzsch AM, Bachmann H, Fürst P, Biesalski HK. Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free Radical Biology & Medicine* 1996; 20: 251-256.
23. Levini RL, Garland D, Oliver CN, Amiei A, Climent I, Lenz A. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology* 1990; 186: 464-68.
24. Nelson DP, Kiesow L A. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25°C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV). *Analytical Biochemistry* 1972; 49: 474-478.
25. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1959; 70-77.

26. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 1976; 72: 248-254.
27. Fu S, Davies M, Stocker R, Dean R. Evidence of roles of radicals in oxidation in advanced human atherosclerotic plaque. *The Biochemical Journal* 1998; 333: 519-525.
28. Traystman RJ, Kirsch JR, Koehler RC. Oxygen radical mechanisms of brain injury following ischemia and reperfusion. *Journal of Applied Physiology* 1991; 71: 1185-1195.
29. Wehr H, Ryglewicz D, Rodo M, Pozniak M, Swiderska M, Panezenko B, Stajniak A. In vitro oxidation of low density lipoproteins in patients after ischemic stroke. *Neurologia i Neurochirurgia Polska* 2000; 34: 447-456.
30. Alexandrova ML, Bochev PG, Markova V I, Bechev BG, Popova MA, Danovska MP, Simeonova VK. Oxidative stress in the chronic phase after stroke. *Redox Report* 2003; 8: 169-176.
31. Bir LS, Demir S, Rota S, Köseoglu M. Increased serum malondialdehyde levels in chronic stage of ischemic stroke. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine* 2006; 208: 33-39.

32. Oliver C, Starke-Reed P, Stadtman ER. Oxidative damage to brain proteins, loss of glutamine synthetase activity, and production of free radical during Ischemia/Reperfusion-induced injury to gerbil brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1990; 87: 5144-5147.
33. Chang CY, Lai YC, Cheng TJ, Lau MT, Hu ML. Plasma levels of antioxidant vitamins, selenium, total sulfhydryl groups and oxidative products in ischemic-stroke patients compared to matched controls in Taiwan. *Free Radical Research* 1998; 28: 15-24.
34. El Kossi MM, Zakhary MM. Oxidative stress in the context of acute cerebrovascular stroke. *Stroke* 2000; 31: 1889-1892.
35. Chan PH. Role of oxidants in ischemic brain damage. *Stroke* 1996; 27: 1124-1129.
36. Gariballa SE, Hutchin TP, Sinclair AJ. Antioxidant capacity after acute ischaemia stroke. *The Quarterly Journal of Medicine* 2002; 95: 685-690.
37. Alexandrova M, Bochev P, Markova V, Bechev B, Popova M, Danovska M, Simeonova V. Dynamics of free radical processes in acute ischemic stroke: influence on neurological status and outcome. *Journal of Clinical Neuroscience* 2004; 11: 501-506.

38. Matés JM, Pérez-Gómez C, Castro IN. Antioxidant Enzymes and Human Diseases. *Clinical Biochemistry* 1999; 32: 595-603.

39. Schulz JB, Lindenau J, Seyfried J, Dichgans J. Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *European Journal of Biochemistry* 2000; 267: 4904-4911.

Table 1.

General characteristics of the patients

Characteristic	Control (N=20)	Hypertensive (N=18)	Acute Stroke (N=9)	Chronic Stroke (N=18)
Age range (years)	38-60	46-77	49-76	43-75
Smoking	3	4	4	8
Hypertension	0	18	6	14
Diabetes mellitus	0	3	3	4

* N, number of patients. All determinations were done in samples obtained from all patients included in each groups.

Figure 1.

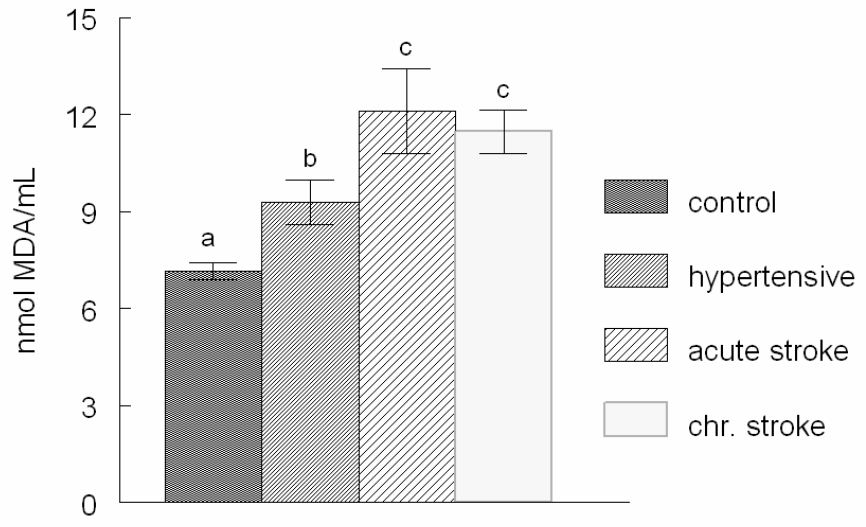


Fig.1

Figure 2.

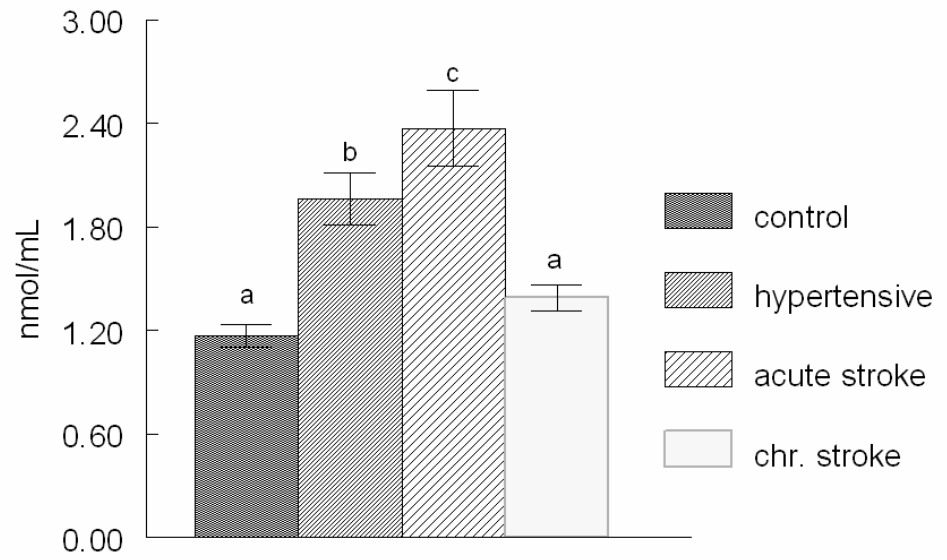


Fig.2

Figure 3.

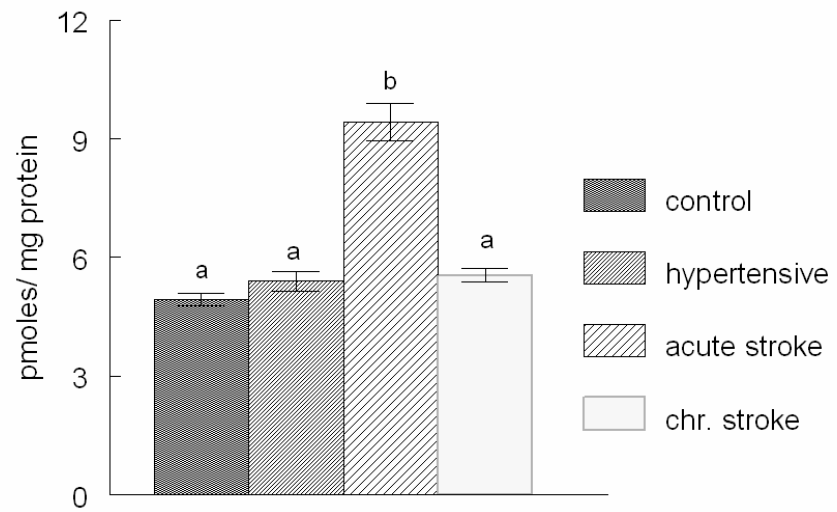


Fig.3

Figure 4.

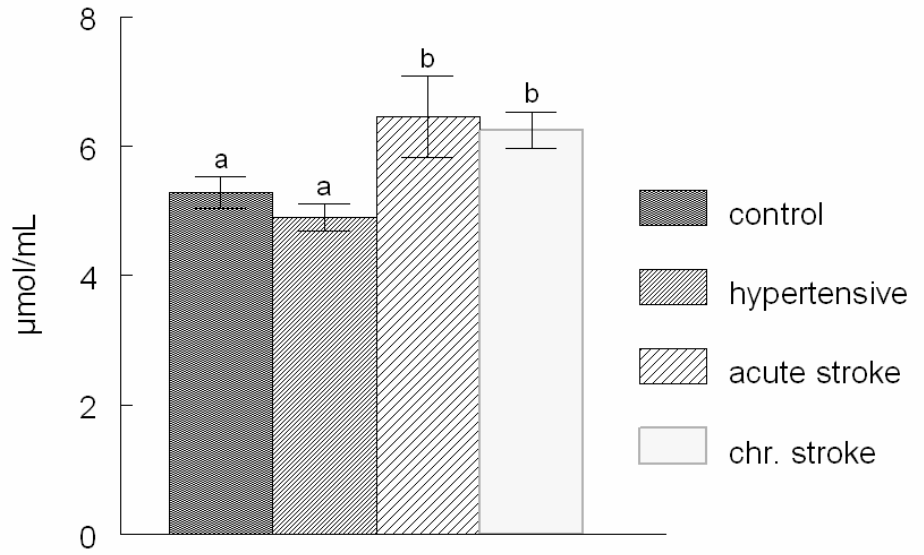


Fig.4

Legends

Fig 1. MDA levels in hypertensive and acute and chronic ischemia groups. Each column represents mean \pm S.E. Duncan's multiple range test: groups that show different letters are statistically different.

Fig 2. Protein carbonylation content in hypertensive and acute and chronic ischemia groups. Each column represents mean \pm S.E. Duncan's multiple range test: groups that show different letters are statistically different.

Fig 3. Catalase activity in hypertensive and acute and chronic ischemia groups. Each column represents mean \pm S.E. Duncan's multiple range test: groups that show different letters are statistically different.

Fig 4. GSH levels in hypertensive and acute and chronic ischemia groups. Each column represents mean \pm S.E. Duncan's multiple range test: groups that show different letters are statistically different.

18. Lapenna D, Gioia S, Ciofani G et al. Antioxidant properties of ticlopine on human low density lipoprotein oxidation. FEBS Letters 1998; 436: 357-360.

**ACTIVITY OF AChE FROM WHOLE BLOOD OF PATIENTS DIAGNOSED WITH
ACUTE AND CHRONIC ISCHEMIA**

**Maísa de Carvalho Corrêa, Paula Acosta Maldonado, Cíntia Saydelles da Rosa,
Rosilene Rodrigues Kaizer, Gilberto Lunkes, Daniele Sausen Lunkes, Maria
Ester Pereira*, Vera Maria Morsch, Maria Rosa Schetinger***

**Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Centro de Ciências
Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa
Maria, RS, Brasil.**

*** Corresponding authors: Fax: +55 (55) 32208978**

e-mail addresses: mariarosa@smail.ufsm.br and pereirame@yahoo.com.br

Brain tissue has a relatively high consumption of oxygen and glucose, and depends almost exclusively on oxidative phosphorylation for energy production. Focal impairment of cerebral blood flow restricts the delivery of substrates and impairs the energy required to maintain ionic gradients (Martin et al. 1994). There are many causes for this disruption and these are collectively referred to as stroke (Zemke et al. 2004). Ischemic stroke results from a transitory or permanent reduction of the cerebral blood flow that is restricted to the major brain artery (Lo et al. 2003; Zemke et al. 2004).

Risk factors for ischemic strokes are multiple and combined: age, hypertension, cigarette smoking, atrial fibrillation, hyperlipidemia and diabetes (Cubriilo-Turek 2004). Ischemic stroke is the leading cause of death and long-term disability in industrialized countries. The majority are not fatal and survivors are at a high risk of subsequent vascular complications and new vascular accidents (Alexandrova & Bochev 2005).

Dementia has become a major public health issue due to the increase of elderly people in the population. Apart from Alzheimer's disease (AD), vascular dementia (VaD) is the second largest cause of dementia in the elderly, representing 15-20% of all cases worldwide (Román 2003). VaD is a common clinical syndrome of intellectual decline and results from ischemic or hemorrhagic cerebrovascular disease (CVD), as well as from hypoperfusive ischemic cerebral injury resulting from cardiovascular and circulatory disorders (Román 2004).

Patients with VaD often show changes in mood and personality, apathy and lack of activity, depressive features, crying spells, perplexity and confusion when doing simple chores. Cognitive impairment in VaD usually has an abrupt onset and cognitive abilities decline over time, generally in a stepwise or fluctuating manner that

may relate to recurrent strokes (Román 2005). There is growing evidence that the cholinergic system is involved in VaD (Grantham & Geerts 2002). In fact, deficits in cholinergic markers have been documented in human cases of VaD, regardless of any concomitant AD pathology (Grantham & Geerts 2002; Román 2005).

Cholinergic mechanisms play a role in the modulation of regional cerebral blood flow (Sato et al. 2001). Moreover, Kirkpatrick and colleagues (2005) demonstrated the existence of essential cholinergic elements such as ChAT (choline acetyltransferase), VAcHT (vesicular acetylcholine transporter) and ACh in the human endothelium.

The literature data have demonstrated that one of the main mechanisms responsible for appropriate cholinergic function is performed by the acetylcholinesterase (AChE) enzyme (Appleyard 1992). It plays an established role in cholinergic transmission by hydrolyzing, and thus terminating the action of the transmitter acetylcholine (ACh) (Schetinger et al. 1996; Soreq & Setman 2001). Furthermore, high levels of AChE activity are found in non-neuronal tissues such as erythrocytes, platelets and lymphocytes (Rakonezay et al. 2005).

Red blood cell acetylcholinesterase (RBC– AChE) is easily obtained from humans and presents a structure and mechanistic property similar to brain synapse AChE (Thiermann et al. 1997; Worek et al. 1997). Therefore, it is possible that AChE activity is related to both the mechanisms involved in the response to hypertension and ischemic stroke and those involved in their adaptive and compensatory effects.

As hypertension is present in 70% of all the strokes (Cubrilo-Turek 2004), we considered the analysis of the influence of hypertension to be of extreme importance. Therefore, our study aimed to evaluate the activity of AChE in red blood cells in

patients diagnosed with ischemic stroke, both acute and chronic, as well as subjects diagnosed with hypertension alone.

For this study, we selected 22 patients from the Neurology Out-patient Center of the Federal University of Santa Maria Hospital to form the chronic group. The acute group consisted of 9 patients with clinical symptoms of ischemia, admitted to the emergency room of the above mentioned hospital within a few hours after the onset of the neurological deficit. The Computed Tomography (CT) scan of the brain was performed to exclude the possibility of intracranial hemorrhage. The third group was composed of 18 hypertensive subjects, selected from the Assistance Program for Hypertensive Patients, who had been previously diagnosed and were using antihypertensive drugs. The control group included 20 healthy individuals whose ages (38-60 years) were similar to patients in other groups. The study was approved by the Human Ethical Committee of the Federal University of Santa Maria, protocol number 96/05, Brazil. All the participants signed free consent before the blood was collected. Vascular risk factors, including hypertension (HT), diabetes mellitus (DM) and smoking habits were recorded for each patient. Some of the individuals in the acute and convalescent phase of ischemic stroke were also using antihypertensive drugs, and/or insulin, and/or statins. The patient's general characteristics are shown in Table 1.

The blood was collected in vacuotainer tubes using EDTA as anticoagulant. The samples were hemolyzed with phosphate buffer 0.1M, pH 7.4 containing Triton X-100 (0.03%) and stored at -20 °C for one week.

Erythrocyte AChE activity was determined by the method of Ellmann et al. (1961) modified by Worek et al. (1999). The specific activity of erythrocyte AChE was

calculated from the quotient between AChE activity and hemoglobin content and the results are expressed as mU/ μ mol Hb.

According to Table 1, the main risk factors for ischemic stroke, HT, DM and smoking, are present in all groups of this study. AChE activities are shown in figure 1. One-way ANOVA revealed a significant effect of these pathologies on enzyme activity [$F(3,65)=28.607$; $p<0.001$]. Duncan's *post hoc* comparisons showed that the activity of erythrocyte AChE from acute ischemic patients was significantly higher than that presented by the control, hypertensive and chronic stroke patients ($p<0.05$). No significant difference was observed between the chronic and control groups. The hypertensive group presented AChE activity significantly lower than the other groups.

Stroke is a complex disease originating and developing around the background of genetic predisposition and the interaction between different risk factors that chronically damage blood vessels (Alexandrova & Bochev 2005). It is a problem of social significance and economic consequence since nowadays there are over 50 million stroke survivors in the world (Alexandrova & Bochev 2005).

There is strong evidence from both animal studies and patients with VaD to suggest that impairment of cholinergic function may underlie the symptoms of VaD (Román 2005). Our study revealed higher activity of erythrocyte AChE in patients with acute ischemia in comparison to the other patients. ACh has been shown to have prominent effects on cerebral blood flow (CBF) (Sato et al. 2001). On the other hand, the synthesis of this transmitter is limited by the availability of its precursors, choline (Ch) and acetylCoA, both of which are influenced by the rate of CBF. A certain level of basal ACh release may be necessary to maintain normal levels of CBF, as evidenced by Scremin and Jenden (1996). In pathological conditions such as cerebral ischemia, in which the activity of phospholipase is accelerated, the

enhanced free tissue Ch concentration may further decrease cerebrovascula resistance and preserve CBF levels by promoting the synthesis and release of ACh. Thus, a decline in cholinergic function may help explain the greater morbidity of cerebral ischemia in aging (Scremin & Jenden 1996).

We suggest that the disruption of blood flow that occurs in acute event may be a consequence of the decrease in ACh levels in blood vessels and endothelium cells due to enhanced AChE activity.

Moreover, cholinesterase inhibitors (ChE-I) are widely approved for the symptomatic treatment of patients with mild to moderate AD. The application of ChE-I is based on the cholinergic hypothesis of AD, which claims that AD leads to the deterioration of cholinergic neurotransmission in the cerebral cortex (Lojkowska et al. 2003). There is also increasing evidence to suggest that patients with VaD exhibit cholinergic deficits as well, and that they may benefit from cholinergic replacement therapy (Kumar et al. 2000). It is probable that the increased levels of ACh in the brain after ChE-I treatment may aid in the cholinergic regulation of CBF, resulting in its increase (Lojkowska et al. 2003).

We demonstrated that AChE activity in erythrocyte in the chronic ischemic group was similar to that found in the control subjects. This suggests a probable adaptive mechanism in AChE activity in red blood cells in order to maintain adequate levels of ACh in blood vessels. ACh plays an important role in the modulation of regional blood flow in the brain and thus may be a factor in the improvement of energy metabolism in ischemic regions.

Hypertension is one the most important risk factors for stroke and coronary heart disease, and it is an important risk factor for vascular dementia (Breteler 2000). Our study showed a decrease in erythrocyte AChE activity in the hypertensive group.

We believe that hypertensive vascular pathology may trigger off a compensatory mechanism, increasing the concentration of the neurotransmitter ACh in the blood, since cognition and cerebral blood flow control are intrinsically linked to the functioning of the central cholinergic system (Román & Kalaria 2005). There is relatively little research into the pathoneurochemical changes that occur between the acute and chronic phases of ischemia.

In conclusion this study showed that ischemia, despite being located in the brain, can alter peripheral markers such as erythrocytes, as observed in this study by measuring RBC-AChE. This work also revealed that ischemia had a modulator effect on AChE activity in erythrocytes, in an attempt to maintain adequate levels of the neurotransmitter ACh. Furthermore, this effect was shown to differ for the acute and chronic stages of ischemia.

Acknowledgements

The authors wish to thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

References:

1. Alexandrova, M. L. & P.G. Bochev: Oxidative stress during the chronic phase after stroke. *Free Radic. Biol. Med.* 2005, **39**, 297-316.
2. Appleyard, M. E.: Secreted acetylcholinesterase: non-classical aspects of a classical enzyme. *Trends Neurosci.* 1992, **15**, 485-490.
3. Breteler, M. M.: Vascular risk factors for Alzheimer's disease: An epidemiologic perspective. *Neurobiol. Aging* 2000, **21**, 153-160.
4. Cubrilo-Turek, M.: Stroke risk factors: recent evidence and new aspects. *Int. Congr. Ser.* 2004, **1262**, 466-469.
5. Ellman, G. L., D. K. Courtney, V. Andres & R. M. Featherstone: A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 1961, **7**, 88-95.
6. Grantham, C. & H. Geerts: The rationale behind cholinergic drug treatment for dementia related to cerebrovascular disease. *J. Neurol. Sci.* 2002, **203-204**, 131-136.
7. Kirkpatrick, C. J., F. Bittinger, R. E. Unger, J. Kriegsmann, H. Kibinger & I. Wessler: The Non-neuronal Cholinergic System in the Endothelium: Evidence and Possible Pathobiological Significance. *Jpn. J. Pharmacol.* 2001, **85**, 24-28.

8. Kumar, V., R. Annad, J. Messina, R. Hartman & J. Veach: An efficacy and safe analysis of Exelon in Alzheimer's disease patients with concurrent vascular risk factors. *Eur. J. Neurol.* 2000, **7**, 159-169.
9. Lo, E. H., T. Dalkara & M. A. Moskowitz: Mechanisms, Challenges and opportunities in Stroke. *Nat. Rev. Neurosci.* 2003, **4**, 333-414 .
10. Lojkowska, W., D. Ryglewicz, T. Jedrzejczak, S. Minc, T. Jakubowska, H. Jarosz & A. Bochynska: The effect of cholinesterase inhibitors on the regional blood flow in patients with Alzheimer's disease and vascular dementia. *J. Neurol. Sci.* 2003, **216**, 119-126.
11. Martin, R. L., H.G. Lloyd & A. I. Cowan: The early events of oxygen and glucose deprivation: setting the scene for neuronal death? *Trends Neurosci.* 1994, **17**, 251-257.
12. Rakonezay, Z., Z. Horváth, A. Juhász, & J. Kálmán: Peripheral cholinergic disturbances in Alzheimer's disease. *Chem. Biol. Interact.* 2005, **157-158**, 233-238.
13. Román, C. G.: Stroke, cognitive decline and vascular dementia: the silent epidemic of the 21st century. *Neuroepidemiology* 2003, **22**, 161-164.
14. Román, C.G.: Brain hypoperfusion a critical factor in vascular dementia. *Neurol. Res.* 2004, **26**, 454-458.

15. Román, CG.: Cholinergic Dysfunction in Vascular Dementia. *Curr. Psychia Rep.* 2005, **7**, 18-26.
16. Román, G. C. & R. N. Kalaria: Vascular determinants of cholinergic deficits in Alzheimer disease and vascular dementia. *Neurobiol Aging* 2005, **18**, 1-17.
17. Sato, A., Y. Sato & S. Uchida: Regulation of regional cerebral blood flow by cholinergic fibers originating in the basal forebrain. *Int. J. Dev. Neurosci.* 2001, **19**, 327-337.
18. Schetinger, M. R. C., N. M. Porto, M. B. Moretto, V. M. Morsch, J. B. T Rocha, V. Vieira, F. Moro, R. T. Neis, S. Bittencourt, H. G. Bonacorso & N. Zanatta: New benzodiazepines alter acetylcholinesterase and ATP-Dases activities. *Neurochem. Res.* 2000, **25**, 949-955.
19. Scremin, O. U. & D. J. Jenden: Cholinergic control of cerebral blood flow in Stroke, Trauma and Aging. *Life Sci.* 1996, **58**, 2011-2018.
20. Soreq, H. & S. Seidman: Acetylcholinesterase – new roles for na old actor. *Nat. Rev. Neurosci.* 2001, **2**, 294-302.
21. Thiermann H, U. Mast, R. Klimmek, P. Eyer, A. Hibler, R. Pfab, N. Felgenhauer & T. Zilker: Cholinesterase status, pharmacokinetics and laboratory findings during obidoxime therapy in organophosphate poisoned patients. *Hum. Exp. Toxicol.* 1997, **16**, 473-480.

22. Zemke, D., J. L. Smith, M. J. Reeves & A. Majid: Ischemia and Ischemic Tolerance in the Brain an Overview. *Neurotoxicology* 2004, **25**, 895-904.
23. Worek, F., M. Backer, H. Thiermann, L. Szinicz, U. Mast, R. Klimmek & P. Eyer: Reappraisal of indications and limitations of oxime therapy in organophosphate poisoning. *Hum. Exp. Toxicol.* 1997, **16**, 466-472.
24. Worek, F., U. Mast, D. Kiderlen, C. Diepold & P. Eyer: Improved determination of acetylcholinesterase activity in human whole blood. *Chim.Clin. Acta* 1999, 288, 73-90.

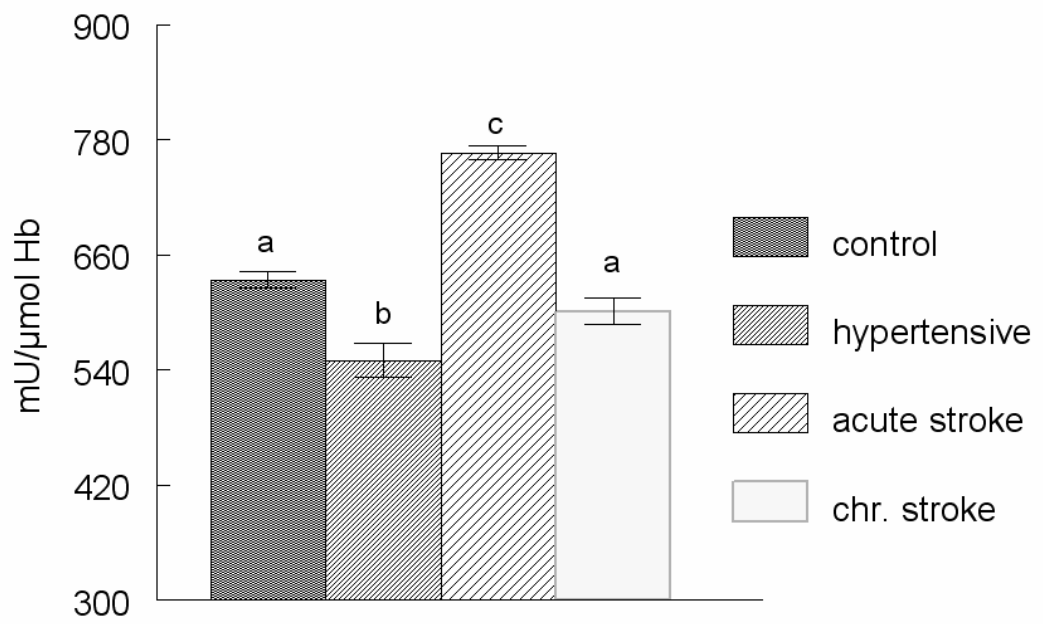
Table 1.

General characteristics of patients

Characteristic	Control (N=20)	Hypertensive (N=18)	Acute Stroke (N=9)	Chronic Stroke (N=22)
Age range (years)	38-60	46-77	49-76	43-75
Smoking	3	4	4	8
Hypertension	0	18	6	14
Diabetes mellitus	0	3	3	4

* N, number of patients.

Figure 1



Legends

Fig 1. Erythrocyte AChE activity in hypertensive and acute and chronic ischemic groups. Each column represents mean \pm S.E. Duncan's multiple range test: groups that show different letters are statistically different.

4. DISCUSSÃO

O acidente vascular cerebral é uma patologia complexa desenvolvida a partir de antecedentes de predisposição genética e interação entre diferentes fatores de risco que cronicamente causam dano aos vasos sanguíneos (Alexandrova & Bochev, 2005).

Está bem estabelecido, que mesmo sob condições fisiológicas, o metabolismo neuronal e glial produz EROs (Halliwell, 1992). O encéfalo mostra-se particularmente vulnerável ao estresse oxidativo; devido ao fato de conter altas concentrações de ferro, o qual participa na catálise de radicais livres, ser rico em lipídeos com ácidos graxos insaturados e possuir baixo sistema protetor antioxidante (Margaill et al., 2005). Após o evento isquêmico e particularmente durante a reperfusão tecidual, a excessiva produção de radicais livres, superando a capacidade antioxidante, está diretamente associada ao dano neuronal (Margaill et al., 2005). As EROs podem contribuir para a morte neuronal atacando macromoléculas como lipídeos, proteínas e ácidos nucléicos (Sugawara et al., 2002).

A medida do MDA, um dos bem conhecidos produtos da lipoperoxidação (Alexandrova & Bochev, 2005; Cherubini et al., 2005) vem sendo usada como marcador da condição oxidativa. Existem vários estudos demonstrando níveis elevados de MDA sérico em pacientes durante a fase aguda do AVCi quando comparados com controles saudáveis (Demirkaya et al., 2001; Polidori et al., 2002; Bolokadse et al., 2004). No entanto há poucos trabalhos monitorando o nível de produtos da lipoperoxidação no estágio convalescente desta patologia (Wher et al., 2000; Alexandrova et al., 2003).

O presente estudo mostrou níveis de MDA sérico aumentados no grupo hipertenso, demonstrando que este fator de risco *per se* foi responsável por tal aumento, contribuindo para o dano oxidativo celular e tecidual. Entretanto, pacientes durante a fase aguda, assim como no estágio convalescente do evento isquêmico, revelaram níveis mais altos de MDA sérico do que aqueles encontrados no grupo hipertenso e no controle. Assim, estes resultados demonstraram que níveis elevados de MDA sérico foram independentes da elevação pelo tradicional fator de risco, hipertensão. Os achados na fase crônica do AVCi estão de acordo com o estudo de Alexandrova et al. (2003) e concorda com as interpretações dos autores quando sugerem que as contradições observadas em estudos prévios podem ser resultado

da heterogeneidade do acidente vascular, de fatores de risco e da metodologia usada.

Diferentes tipos de modificação oxidativa de proteínas podem ser induzidas diretamente por EROs ou indiretamente por reações de produtos secundários do estresse oxidativo (Donne et al., 2003). A importância da modificação oxidativa de proteínas e a formação de grupos carbonil (CO) na cadeia lateral de aminoácidos suscetíveis vêm sendo largamente estudados. A formação da proteína carbonil parece ser um fenômeno comum durante a oxidação e sua quantificação pode ser usada como um biomarcador do dano protéico (Donne et al., 2003).

Este estudo confirma os resultados encontrados na literatura, indicando que a modificação oxidativa de enzimas e proteínas estruturais desempenha um papel importante na etiologia e/ou avanço de várias doenças humanas como revisado por Donne et al. (2003). Ainda, verificou-se aumento no conteúdo de proteína carbonil no grupo hipertenso e nos pacientes pertencentes à fase aguda da patologia cerebrovascular isquêmica, quando comparados com o grupo isquêmico crônico e controle. Diferentemente dos resultados demonstrados por Chan et al. (1998) este estudo revelou um aumento no conteúdo de proteína carbonil no grupo isquêmico agudo, o qual apresentou níveis mais altos de oxidação protéica também em relação aos pacientes hipertensos. Inesperadamente, o conteúdo de proteína carbonil encontrado em pacientes durante o estágio convalescente do AVCi foi menor que o do grupo hipertenso, apesar da maioria dos pacientes apresentar hipertensão prévia.

Os antioxidantes com alto potencial redutor, assim como as enzimas antioxidantes intracelulares são parte do mecanismo de proteção do organismo a fim de superar a formação de espécies pró-oxidantes durante a isquemia/reperfusão (Zimmermann et al., 2004). Acredita-se que a capacidade antioxidante do plasma e dos eritrócitos pode desempenhar um papel importante contra o dano neurológico causado pelo estresse oxidativo associado ao AVCi (Leinonen et al., 2000).

De acordo com Alexandrova et al. (2004), a capacidade antioxidante sanguínea foi modificada na fase aguda do acidente cerebrovascular isquêmico, verificada pelo aumento da atividade das enzimas CAT e GSHPx, independente da severidade do infarto. Os resultados também mostraram que pacientes que fazem uso de fármacos antihipertensivos por longo período de tempo apresentaram menor atividade da enzima CAT. Os resultados deste estudo estão de acordo com os citados acima, revelando um aumento na atividade da CAT em sangue total de

pacientes na fase aguda da patologia cerebral isquêmica. No grupo hipertenso e nos pacientes pertencendo ao estágio crônico, a atividade da CAT permaneceu inalterada quando comparada ao grupo controle. Acredita-se que o aumento da atividade da CAT durante o evento agudo atua como defesa endógena primária contra a produção de EROs pela isquemia/reperfusão.

A GSH é um antioxidante não-enzimático e atua como um doador de prótons na reação catalisada pela GSHPx (Gul et al., 2000). Sabe-se que níveis diminuídos de GSH vêm sendo encontrados em inúmeras doenças neurodegenerativas em estado de estresse oxidativo assim como no processo normal do envelhecimento (Zimmermann et al., 2004). Este estudo revelou um aumento nos níveis da GSH em ambos os grupos isquêmicos, agudo e crônico, quando comparados aos pacientes hipertensos e ao grupo controle, demonstrando o efeito protetor contra o dano oxidativo causado pela isquemia.

A acetilcolina (ACh) é um neurotransmissor de grande significado na função do sistema nervoso central e periférico. Este neurotransmissor está associado com a função cognitiva, processamento da informação sensorial, organização cortical do movimento e controle do fluxo de sangue cerebral (Fibiger, 1991). Existem evidências crescentes a partir de estudos em modelos animais assim como em pacientes com demência vascular, sugerindo que o prejuízo da função colinérgica está relacionado com alguns sintomas da demência vascular. Este estudo revelou um aumento da atividade da AChE eritrocitária na fase aguda do AVCi quando comparada com o grupo hipertenso, crônico e indivíduos controle. A síntese da ACh é limitada pela disponibilidade de seus precursores, colina (Ch) e acetil CoA, os quais são influenciados pela velocidade do fluxo sanguíneo. Como evidenciado por Scremin & Jenden (1996), a presença de níveis basais de ACh pode ser necessária para manter níveis normais do fluxo sanguíneo cerebral. Dessa forma, o declínio da função colinérgica pode contribuir para a maior morbidade da isquemia cerebral na idade avançada (Scremin & Jenden 1996). Sugere-se que o aumento da atividade da AChE eritrocitária, levando ao decréscimo dos níveis da ACh nos vasos sanguíneos e células endoteliais, pode ser uma das possíveis causas que contribui para a interrupção do fluxo sanguíneo que ocorre no evento isquêmico agudo.

O presente estudo demonstrou que a atividade da AChE em eritrócitos no grupo crônico foi similar àquela encontrada no controle. Isto sugere um provável

mecanismo adaptativo da enzima a fim de manter adequados níveis de ACh nos vasos sanguíneos.

A hipertensão é um dos principais fatores de risco para o acidente vascular e doenças coronarianas, bem como para a demência vascular (Breteler, 2000). Este estudo mostrou uma menor atividade da AChE no grupo hipertenso, sugerindo que a patologia vascular hipertensiva pode desencadear um mecanismo compensatório, aumentando a concentração da ACh, desde que o sistema colinérgico desempenha um importante papel na modulação do fluxo sanguíneo cerebral e na cognição (Román & Kalaria, 2005).

Em resumo, pode-se concluir que apesar de ter localização definida, o evento isquêmico resulta em uma desordem sistêmica que provoca alterações bioquímicas, as quais podem ser detectadas periféricamente pela medida de indicadores do estresse oxidativo e pela atividade da enzima AChE sanguínea.

5. CONCLUSÕES

- O perfil oxidativo de lipídeos e proteínas, representados pelos níveis de MDA e conteúdo de proteína carbonil, respectivamente, sugere o aumento da formação de EROs, as quais estão associadas ao dano biológico celular presente na fase aguda do acidente vascular isquêmico e na hipertensão; suportando a idéia que esta última atue como um prevalente fator de risco, contribuindo para o dano oxidativo;
- O aumento dos indicadores de defesa antioxidante, estimado pela atividade da CAT e pelos níveis de GSH sustentam a ocorrência do estresse oxidativo nos pacientes com diagnóstico agudo em consequência da isquemia/reperfusão; acredita-se que o perfil oxidativo observado em pacientes com diagnóstico de AVCi crônico, verificado pelo aumento dos níveis de MDA sérico e GSH, esteja relacionado com a presença dos fatores de risco;
- A atividade da AChE sanguínea apresentou-se inalterada no estágio convalescente do AVCi, enquanto que na fase aguda desta patologia, os pacientes apresentaram maior atividade desta enzima, sugerindo que o acidente vascular isquêmico exerce efeito modulador sobre a AChE eritrocitária; a menor atividade da AChE eritrocitária apresentada pelos pacientes hipertensos, sem AVCi, sugere que esta patologia também causa disfunção do sistema colinérgico em nível periférico;
- O evento isquêmico resulta em uma desordem sistêmica que provoca alterações bioquímicas, as quais podem ser detectadas periféricamente pela medida de indicadores do estresse oxidativo e pela atividade da enzima AChE sanguínea.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALDUNATE, R.; CASAR, J. C.; BRADAN, F.; INESTROSA, N. C. Structural and functional organization of synaptic acetylcholinesterase. **Brain Research Review**, v. 47, p. 96-104, 2004.

ALEXANDROVA, M. L.; BOCHEV, P. G.; MARKOVA, V. I.; BECHEV, B. G.; POPOVA, M. A.; DANOVSKA, M. P.; SIMEONOVA, V. K. Oxidative stress in the chronic phase after stroke. **Redox Report**, v.8, p.169-76, 2003.

ALEXANDROVA, M.; BOCHEV, P.; MARKOVA, V.; BECHEV, B.; POPOVA, M.; DANOVSKA, M.; SIMEONOVA, V. Dynamics of free radical processes in acute ischemic stroke: influence on neurological status and outcome. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 11, p. 501-506, 2004.

ALEXANDROVA, M. L.; BOCHEV, P. G. Oxidative stress during the chronic phase after stroke. **Free Radical Biology & Medicine**, v.39, p. 297-316, 2005.

APPLEYARD, M. E. Secreted acetylcholinesterase: non-classical aspects of a classical enzyme. **Trends in Neuroscience**, v. 15, p. 485-490, 1992.

BARTOLINI, M.; BERTUCCI, C.; CAVRINI, V.; ANDRISANO, V. β -Amyloid aggregation induced by human acetylcholinesterase: inhibition studies. **Biochemical Pharmacology**, v. 65, p. 407-416, 2003.

BARTUS, R. T.; DEAN, R.L.; BEER, B.; LIPPA, A.S. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. **Science**, v. 217, p. 408-414, 1982.

BEAL, M. F.; HYMAN, B. T.; KOROSHETZ, W. Do defects in mitochondrial metabolism underlie the pathology of neurodegenerative disease? **Trends in Neuroscience**, v. 16, p. 125-131, 2003.

BENNEDITO, G. Drogas que afetam o Sistema Nervoso Parassimpático e Gânglios Autônomos. In: O'Neill, J. O., Doukas, P. H. **Farmacologia Clínica**: Guanabara Koogan, 1997.

BERLETT, B. S.; STADMAN, E. R. Protein oxidation in aging, disease and oxidative stress. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272 p. 20313-20316, 1997.

BIR, L. S.; DEMIR, S.; ROTA, S.; KÖSEOĞLU, M. Increased serum malondialdehyde levels in chronic stage of ischemic stroke. **The Tohoku Journal of Experimental Medicine**, v. 208, p. 33-39, 2006.

BOLOKADZE, N.; LOBJANIDZE, I.; MOMTSELIZE, N.; SOLOMONIA, R.; SHAKARISHVILI, R.; MCHEDLISHVILI, G. Blood rheological properties and lipidperoxidation in cerebral and systemic circulation of neurocritical patients. **Clinical Hemorheology and Microcirculation**, v. 30, p. 99-105, 2004.

BRETELER, M. M. Vascular risk factors for Alzheimer's disease: An epidemiologic perspective. **Neurobiology of Aging**, v. 21, p. 153-160, 2000.

CAO, W.; CARNEY, J. M., DUCHON, A.; FLOYD, R. A.; CHEVION, M. Oxygen free radical involvement in ischemia and reperfusion injury to brain. **Neuroscience Letters**, v. 88, p. 233-238, 1988.

CASADO, A.; DE LA TORRE, R.; LÓPEZ-FERNANDES, M. E.; GIL, P.; EGIDIO, J. Á. Enzimas em el infarto cerebral agudo. **Neurologia**, v. 19, p. 5-9, 2004.

KLAASSEN, C. D., AMDUR, M. O., DOULL, J (Eds). **Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons**, 5th ed. New York: MacGraw-Hill, 1996.

CHANG, C. Y.; LAI, Y. C.; CHENG, T. J.; LAU, M. T.; HU, M. L. Plasma levels of antioxidant vitamins, selenium, total sulfhydryl groups and oxidative products in ischemic-stroke patients compared to matched controls in Taiwan. **Free Radical Research**, v. 28, p. 15-24, 1998.

CHAVES, M. L. F. Acidente vascular encefálico: conceituações e fatores de risco. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 4, p. 372-382, 2000.

CHERUBINI, A.; RIGGIERO, C.; POLIDORI, C.; MECOCCHI, P. Potential markers of oxidative stress in stroke. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 39, p. 841-852, 2005.

CUBRILLO-TUREK, M. Stroke risk factors: recent evidence and new aspects. **International Congress Series**, v. 1262, p.466-469, 2004.

CULMSEE, C.; KRIEGLSTEIN, J. Mechanisms of neuronal degeneration after ischemic stroke – Emerging targets for novel therapeutic strategies. **Drug Discovery Today: Disease Mechanisms**, v. 2, p. 463- 470, 2005.

DANIELISOVÁ, V.; NÉMATHOVÁ, M.; GOTTLIEB, M.; BURDA, J. Changes o Endogenous Antioxidant Enzymes during Ischemic Tolerance Acquisition **Neurochemical Research**, v. 30, p. 559-565, 2005.

DEAN, R. T.; FU, S.; STOCKER, R.; DAVIES, M. J. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. **The Biochemical Journal**, v. 324, p 1-18, 1997.

DEMIRKAYA, S.; TOPÇUOĞLU, M. A.; AYDIM, A.; ULAS, U. H.; ISIMER, A. L., VURAL, O. Malondialdehyde, glutathione peroxidase and superoxide dismutase in peripheral blood erythrocytes of patients with acute cerebral ischemia. **European Journal of Neurology**, v. 8, p. 43-51, 2001.

DIRNAGL, U.; IADECOLA, C.; MOSKOWITZ A. Pathobiology of ischaemic Stroke: an integrated view. **Trends in Neurosciences**, v. 22, p. 391-397, 1999.

DONNE, I. D.; ROSSI, R.; GIUSTARINI, D.; MILZANI, A.; COLOMBO, R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. **Clinica Chimica Acta** , v. 329, p. 23-38, 2003.

DONNE, I. D.; GIUSTARINI, D.; COLOMBO, R.; ROSSI, R.; MILZANI, ^a Protein carbonylation in human diseases. **Trends in Molecular Medicine**, v. 9, p. 169-176, 2003.

ERKINJUNTTI, T.; ROMÁM G.; GAUTHIER, S. Treatment of vascular dementia – evidence from clinical trials with cholinesterase inhibitors. **Journal of the Neurological Science**, v. 226, p. 63-66, 2004.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, p. 61-68, 1997.

FIBIGER, H. C. Cholinergic mechanisms in learning, memory and dementia: A review of recent evidence. **Trends in Neuroscience**, v. 14, p. 220-223, 1991.

FUCHS, S. F.; LESSA, J. R.; NUNES, A. H. Hipertensão arterial sistêmica e acidente vascular encefálico: a magnitude do risco. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 4, p. 347-50, 2000.

GOLDBERG, W. J.; DORMAN, R. V.; DABROWIECKI, Z.; HORROCKS, L. A. The effects of ischemia and CDPamines on Na⁺, K⁺ - ATPase and acetylcholinesterase activities in rat brain. **Neurochemical Pathology**, v. 3, p. 237-248, 1985.

GOTTIFRIES, C. G.; BLENNOW, K.; KARLSSON, I.; WALLIN, A. The neurochemistry of vascular dementia. **Dementia**, v. 5, p. 163-167, 1994.

GRANTHAM, C.; GEERTS, H. The rationale behind cholinergic drug treatment for dementia related to cerebrovascular disease. **Journal of the Neurological Science**, v. 203-204, p 131-136, 2002.

GUL, M.; KUTAY, F. Z.; TEMOCIN, S.; HAANNINEN, O. Cellular and Clinical implications of ,glutathione. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 38, p. 625-634, 2000

HACHINSKI, V. Vascular dementia: a radical redefinition. **Dementia**, v. 5, p. 130-132, 1994.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species and the central nervous system. **Journal of Neurochemistry**, v. 59, p. 1609-1623, 1992.

HOMI, H.M.; FREITAS, J. J. S.; CURI, R.; VELASCO, I. T.; JUNIOR, B. A. S. Changes in superoxide dismutase and catalase activities of rat brain regions during early global transient ischemia/reperfusion. **Neuroscience Letters**, v. 333, p. 37-40, 2002.

KALARIA, R. N.; BALLARD, C. Overlap between pathology of Alzheimer disease and vascular dementia. **Alzheimer Disease and Associated Disorders**, v 13 (Suppl), p S115-123, 1999.

KASHYAP, M. K.; YADAV, V., SHERAWAT, B. S.; JAIN, S.; KUMARI, S.; KHULLAR, M.; SHARMA, P. C.; NATH, R. Different antioxidant status, total antioxidant power and free radical in essential hypertension. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 277, p. 89-99, 2005 .

KIRKPATRICK, C. J.; BITTINGER, F.; UNGER, R. E.; KRIEGSMANN, J.; KILBINGER, H.; WESSLER, I. The Non-neuronal Cholinergi System in the Endothelium: Evidence and Possible Pathobiological Significance. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 85, p. 24-28, 2001.

KORNATOWSKA, K. K.; CZUCZEJKO, J.; PAWLUK, H.; KORNATOWSKI, T. MOTYL, J.; SZADURSKI, L. S.; GOLEC, K. S.; KEDZIORA, J. The markers of oxidative stress and activity of the antioxidant system in the blood of elderly patients with essential arterial hypertension. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v. 9, p. 635-641, 2004.

LEINONEN, J. S.; AHONEN, J. P.; LONNROT, K.; LEHKONEN, M.; DASTIDAR, P.; MOLNAR, G.; ALHO, H. Low plasma antioxidant activity is associated with high lesion volume and neurological impairment in stroke. **Stroke**, v. 31, p. 33-39, 2000.

LO, E. H.; DALKARA, T.; MOSKOWITZ, M. A. Mechanisms, Challenges and opportunities in Stroke. **Nature Reviews in Neuroscience**, v.4, p. 333-414, 2003.

LOJKOWSKA, W.; RYGLEWICZ, D.; JEDRZEJCZAK, T.; MINC, S.; JAKUBOWSKA, T.; JAROSZ, H.; BOCHYNSKA, A. The effect of cholinesterase inhibitors on the regional blood flow in patients with Alzheimer's disease and vascular dementia. **Journal of the Neurological Science**, v. 216, p. 119-126, 2003.

MALATOVÁ, Z., MARSALA, J. Cholinergic enzymes in spinal cord infarction. Biochemical and histochemical changes. **Molecular and Chemical Neuropathology**, v. 19, p. 283-296, 1993.

MALATOVÁ, Z.; GOTTLIEB, M.; MARSALA, J. Depression of acetylcholinesterase synthesis following transient cerebral ischemia in rat: pharmacohistochemical and biochemical investigation. **General Physiology and Biophysics**, v. 18, p. 57-71, 1999.

MARGAILL, I.; PLOTKINE, M.; LEROUET, D. Antioxidant strategies in the treatment of stroke. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 39, p. 429-443, 2005.

MASSOULIÉ, J.; PEZZEMENTI, L.; BOM, S.; KREJCI, E. Molecular and cellular biology of cholinesterase. **Progress in Neurobiology**, v. 41, p. 31-41, 1993.

MATÉS, J. M.; PÉREZ-GÓMEZ, C.; CASTRO, I. N. Antioxidant Enzymes and Human Diseases. **Clinical Biochemistry**, v. 32, p. 595-603, 1999.

MORO, M. A.; ALMEIDA, A.; BOLAÑOS, J. P.; LIZASOAIN, I. Mitochondrial respiratory chain and free radical generation in stroke. **Free Radical Biology & Medicine**, v.39,p.1291-1304,2005.

NIGG, H. N.; KNAAK, J. B. Blood CHOLINESTERASES AS human Biomarkers Organophosphorus Pesticide Exposure. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 163, p. 29-112, 2000.

NUNES-TAVARES, N.; MATTA, A. N.; BATISTA E SILVA, C. M.; ARAÚJO, G. M. N.; LOURO, S. R. W.; HASSON-VOLOCH, A. Inhibition of acetylcholinesterase from *Electrophorus electricus* (L.) by tricyclic antidepressants. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 34, p. 1071-1079, 2002.

OHTA, Y.; TSUCHIHASHI, T.; IBAYASHI, S.; MATSUMURA, K.; KITAZONO, T.; OOBOSHI, H.; KAMOUCI, M.; FUJÜK, K.; IIDA, M. Blood pressure control in Hypertensive Patients with a history of stroke. **Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases** v.14, p. 229-233, 2005.

OLIVER, C.; STARKE-REED, P.; STADTMAN, E. R. Oxidative damage to brain proteins, loss of glutamine synthetase activity, and production of free radical during Ischemia/Reperfusion- induced injury to gerbil brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, p. 5144-5147, 1990.

ONTENIENTE, B.; COURIAUD, C.; BRAUDEAU, J.; BENCHOUA, A.; GUEGAN, C. The mechanisms of cell death in focal cerebral ischemia highlight neuroprotective perspectives by anti-caspases therapy. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, p. 1643-1649, 2003.

OTT, E.O.; ABRAHAM, J.; MEYER, J. S.; ACHARI, A. N.; CHEE, A. N.; MATHEW, N. T.; Disordered cholinergic neurotransmission and dysautoregulation after acute cerebral infarction. **Stroke**, v. 6, p. 172-180, 1975.

PARSONS, S. M.; PRIOR, C.; MARSHALL, I. G. Acetylcholine transport, storage, and release. **International Review of Neurobiology**, v. 35, p. 279-390, 1993 (abstract).

PATRICK, G. L. **An Introduction to Medicinal Chemistry**. 2nd, Oxford, p 432-482, 2001

PIRES, S. L.; GAGLIARDI, R. J.; GORZONI, M. L. Estudo das frequências dos principais fatores de risco para Acidente Vascular Cerebral isquêmico em idosos. **Arquivos em Neuropsiquiatria**, v. 62, p. 844-851, 2004.

POLIDORI, M. C.; CHERUBINI, A.; STAHL, W.; SENIN, U.; SEIS, H.; MECOCCHI, Plasma carotenoid and malondialdehyde levels in ischemic stroke patient relationship to early outcome. **Free Radical Research**, v. 36, p. 265-268, 2002.

PRADO, M. A. M.; REIS, R. A. M.; PRADO, F. V.; MELLO, M. C. GOMEZ, M. V.; MELLO, F. G. Regulation of acetylcholine synthesis and storage. **Neurochemistry Internacional**, v. 41, p. 291-299, 2002.

RAKONEZAY, Z.; HORVÁTH, Z.; JUHÁSZ, A.; KÁLMÁN, J. Peripheral cholinergic disturbances in Alzheimer's disease. **Chemical- Biological Interactions**, v.157-158: p. 233-238, 2005.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. Dependência e abuso de fármacos. In: Rang, H. P.; Dale, M. M.; Ritter, J. M.; Moore, P. K. (Ed). **Farmacologia**. Elsevier, Sao Paulo, Brasil, p. 674-695, 2004.

REDON, J.; OLIVA, M. R.; TORMOS, C.; GINER, V.; CHAVES, J.; IRADI, A.; SAEZ, G.T. Antioxidant activities and oxidative stress by products in human hypertension. **Hypertension**, v.41, p. 1096-1101, 2003.

ROCKWOOD, K. Vascular cognitive impairment and vascular dementia. **Journal of Neurological Science**, v. 203-204, p. 23-27, 2002.

ROMÁN, C. G. Cholinergic Dysfunction in Vascular Dementia. **Current Psychiatry Reports**, v. 7, p. 18-26, 2005.

ROMÁN, G. C.; KALARIA, R. N. Vascular determinants of cholinergic deficits in Alzheimer disease and vascular dementia. **Neurobiology of Aging**, v. 18, p. 1-17, 2005.

RUSSO, C.; OLIVIERI, O.; GIRELLI, D.; FACCINI, G.; LAMBARTI, M. L. Z.; CORROCHER, R. Anti-oxidants status and lipid peroxidation in patients with essential hypertension. **Journal of Hypertension**, v. 16, p.1267-1271, 1998

RUTKOWSKA, M.; STRZYZEWSKI, K.; ISKRA, M.; PIORUNSKA- STOLZMANN, M.; MAJEWSKI, W. Increased protein carbonyl groups in the serum of men with chronic arterial occlusion and the effect of postoperative treatment. **Medical Science Monitor**, v. 11, p. 79-83, 2005.

SÁEZ- VALERO, J. Acetylcholinesterase activity and molecular isoform distribution are altered after focal cerebral ischemia molecular. **Brain Research**, v. 117, p. 240-244, 2003.

SAITO, H.; TOGASHI, H.; YOSHIOKA, M.; NAKAMURA, N.; MINAMI, M.; PARVEZ, H. Animal models of vascular dementia with emphasis on stroke-prone spontaneously hypertensive rats. **Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology**, v. 22(suppl 1), p. S259-259 (abstract).

SCHETINGER, M. R. C.; BONAN, C. D.; FRASSETTO, S. S.; WYSE, A. T. S.; SCHIERHOLT, R. C.; WEBBER, A.; DIAS, R. D.; SARKIS, J. J. F.; NETTO, C. A. Pre-conditioning to global cerebral ischemia changes hippocampal acetylcholinesterase in the rat. **Biochemistry and Molecular Biology International**, v. 47, p. 473-478, 1999.

SCREMIN, O. U.; JENDEN, D. J. Cholinergic control of cerebral blood flow in Stroke, Trauma and Aging. **Life Science**, v. 58, p. 2011-2018, 1996.

SCREMIN, O. U.; LI, M. G.; SCREMIN, A. M.; JENDEN, D. J. Cholinesterase inhibition improves blood flow in the ischemic cerebral cortex. **Brain Research Bulletin**, v. 42, p. 59-70, 1997.

SHIMIZU, H.; KIYOHARA, Y.; KATO, I.; KITAZONO, T.; TANIZAKI, Y.; KUBO, M.; UENO, H.; IBAYASHI, S.; FUJISHIMA, M.; IIDA, M. Relationship between plasma glutathione levels and cardiovascular disease in a defined population The Hisayama Study. **Stroke**, v 35, p. 2072-2077, 2004.

SIEGEL, G. **Basic Neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects**. 6 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Williams, 1999.

SILMAN, I.; SUSSMAN, J. L. Acetylcholinesterase: "classical" and "non-classical" functions and pharmacology. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 5, p. 293-302, 2005.

SOREQ, H.; SEIDMAN, S. Acetylcholinesterase – new roles for an old actor. **Nature Reviews in Neuroscience**, v. 2, p. 294-302, 2001.

SPRANGER, M.; KREMPIEN, S.; SCHWAB, S.; DONNEBERG, S.; HACKE, W. Superoxide dismutase activity in serum of patients with acute cerebral ischemic injury. Correlation with clinical course and infarct size. **Stroke**, v. 28, p. 2425-2428, 1997.

STAMLER, J. S.; SLIKVA, A. Biological chemistry of thiols in the vasculature and in vascular-related disease. **Nutrition Reviews**, v. 54, p. 1-30, 1996.

SUGAWARA, T.; NOSHITA, N.; LEWEN, A.; GASCHÉ, Y.; FERRAND-DRAKE, M.; FUJIMURA, M.; MORITA-FUJIMURA, Y.; CHAN, P. H. Overexpression of copper/zinc superoxide dismutase in transgenic rats protects vulnerable neurons against ischemic damage by blocking the mitochondrial pathway of caspase activation. **Journal of Neuroscience**, v. 22, p. 209-217, 2002.

SUSSMAN, J. L.; HAREL, M.; FROLOW, F.; et al. Atomic structure of acetylcholinesterase from Torpedo California: A prototypic acetylcholine-binding protein. **Science**, v. 253, p. 872-879, 1991.

TAYLOR, P.; RADIC, Z.; The cholinesterases: from gene to proteins. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 34, p. 281-320, 1994.

TAYLOR, P.; BROWN, J. H. Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects, 5 ed In: Siegel et al.(Eds) New York: Raven Press, p. 231-260, 1994

TAYLOR, P.; BROWN, J. H. **Acetylcholine. Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects.** In: Siegel, G. J.; Agranoff, B. W.; Albers, R.W.; Molinoff, P. B. (Ed.). Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, USA, p. 214-242, 1999.

THIERMANN, H.; MAST, U.; KLIMMEK, R.; EYER, P.; HIBLER, A.; PFAB, R.; N. FELGENHAUER, N.; ZILKER, T. Cholinesterase status, pharmacokinetics and laboratory findings during obidoxime therapy in organophosphate poisoned patients. **Human Experimental Toxicology**, v. 16, p. 473-480, 1997.

TOGASHI, H.; MATSUMOTO, M.; YOSHIOKA, M.; HIROKAMI, M.; MINAMI, M.; SAITO, H. Neurochemical profiles in cerebrospinal fluid of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. **Neuroscience Letters**, v. 166, p. 117-120, 1994.

TORRES, B. B. **Nutrição e esporte uma abordagem bioquímica.** Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, USP, 2003

UNGLESS, M. A.; CRAGG, S. J. A Choreography of nicotinic receptors directs the dopamine neuron routine. **Neuron**, v. 15, p. 815-816, 2006.

ZEMKE, D.; SMITH, J. L.; REEVES, M. J.; MAJID, A. Ischemia and Ischemic Tolerance in the Brain: an Overview. **Neurotoxicology**, v. 25, p. 895-904, 2004.

ZIMMERMANN, C.; WINNEFELD, K.; STRECK, S.; ROSKOS, M.; HABERL, R. L. Antioxidant status in Acute Stroke Patients and Patients at stroke Risk. **European Neurology**, v.51, p. 157-61, 2004.

WEHR, H.; RYGLEWICZ, D.; RODO, M.; POZNIAK, M.; SWIDERSKA, M.; PANCZENKO, B.; STAJNIAK, A. In vitro oxidation of low density lipoproteins in patients after ischemic stroke. **Neurologia i Neurochirurgia Polska**, v. 34, p. 447-456, 2000.

WOREK, F.; THIERMANN, H.; SZINICZ, L. Reactivation and aging Kinetics of human acetylcholinesterase inhibited by organophosphonylcholines. **Archives of Toxicology**, v. 78, p. 212-217, 2004.