

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

Eduardo Tanuri Pascotini

**O PAPEL DO POLIMORFISMO Mn-SOD Ala16Val NA FISIOPATOLOGIA DO
ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO CRÔNICO: UM ESTUDO CLÍNICO**

Santa Maria, RS
2019

Eduardo Tanuri Pascotini

**O PAPEL DO POLIMORFISMO Mn-SOD Ala16Val NA FISIOPATOLOGIA DO
ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO CRÔNICO: UM ESTUDO CLÍNICO**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica.**

Orientadora: Prof. Dra. Michele Rechia Fighera
Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Freire Royes

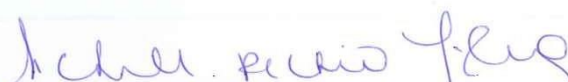
Santa Maria, RS
2019

Eduardo Tanuri Pascotini

**O PAPEL DO POLIMORFISMO Mn-SOD Ala16Val NA FISIOPATOLOGIA DO
ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO CRÔNICO: UM ESTUDO CLÍNICO**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica**.

Aprovado em 17 de Agosto de 2019:



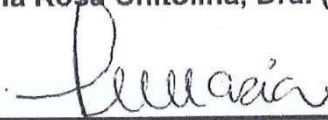
Michele Rechia Fighera, Dra. (Orientadora)



Patrícia Severo do Nascimento, Dra. (UFSM)



Maria Rosa Chitolina, Dra. (UFSM)



Maria Fernanda de Paula Werner, Dra. (UFPR) - Parecer



Rômulo Pillon Barcelos, Dr. (UPF) - Parecer

Pascotini, Eduardo Tanuri
O PAPEL DO POLIMORFISMO Mn-SOD Alal6Val NA
FISIOPATOLOGIA DO ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO CRÔNICO:
UM ESTUDO CLÍNICO / Eduardo Tanuri Pascotini.- 2019.
100 f.; 30 cm

Orientador: Michele Rechia Figuera
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica
Toxicológica, RS, 2019

1. Acidente Vascular Encefálico 2. Estresse Oxidativo
3. Inflamação, Apoptose 4. Dano ao DNA 5. Memória,
Funcionalidade I. Figuera, Michele Rechia II. Título.

“Todo ato tem consequências”

Agradecimentos

À minha família, Vicente, Maria Helena, Daniel e Matheus, base de tudo, alicerce para minha formação pessoal e profissional. Companheira inseparável nestes anos todos de caminhada.

Deus, meu chão quando pareço estar caindo, aos amigos e inimigos obtidos ao longo de uma vida, pois, seja por um lado ou outro, contribuíram para a formação do ser humano que sou hoje.

Professora Michele e Professor Luiz Fernando, pela paciência e ensinamento nesta jornada.

Minha amiga, irmã, tia, Ariane por todo o companheirismo desde a graduação em fisioterapia.

Minha escudeira Aline pela parceria nestes anos de mestrado e doutorado, bem como a Josi, parceria também nesta jornada.

Professores que tive ao longo de toda minha formação acadêmica pelas instruções e ensinamentos, certamente nunca os esquecerei.

Ao pessoal dos laboratórios: Biogenômica e Bioex pela forte parceria, principalmente às professoras: Ivana, Marta, Sara, Mauro e Marilise.

Ao pessoal do grupo de hemiplegia do HUSM pelo apoio, principalmente à professora Ana Lúcia.

À Universidade Federal de Santa Maria, bem como ao CAPES, pelo suporte técnico, estrutural e financeiro.

À todos vocês o meu Muito Obrigado!!!!!!!

RESUMO

Tese de Doutorado

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica

Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil.

O papel do polimorfismo Ala16Val da Mn-SOD no acidente vascular encefálico crônico: um estudo clínico

Autor: Eduardo Tanuri Pascotini

Orientadora: Michele Rechia Fighera

Co-orientador: Luiz Fernando Freire Royes

Local e data de defesa: UFSM, Santa Maria, RS. 17 de Agosto de 2019.

Considerada uma das doenças neurológicas mais frequentes, o acidente vascular encefálico (AVE) apresenta uma alta taxa de morbidade e mortalidade, sendo que o AVE isquêmico corresponde a 85% dos casos. Diversos fatores estão envolvidos na etiologia da doença, como alterações na permeabilidade vascular, estresse oxidativo, inflamação, apoptose e dano ao DNA. Entre outras consequências estão os déficits cognitivos e motores, dependendo da magnitude e tempo da lesão. O polimorfismo de nucleotídeo único MnSOD Ala16Val (SNP) é uma mutação genética da enzima antioxidante superóxido dismutase e está associado a fatores de risco de doenças metabólicas e vasculares, como o AVE. O fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) é uma neurotrofina que, entre várias funções, está associada a regeneração tecidual após lesões vasculares cerebrais. A acetilcolina (ACh) é um neurotransmissor excitatório relacionado com processos mnemônicos, aprendizado e funções motoras. Desta forma, foi objetivo deste estudo investigar a relação entre o polimorfismo da Ala16Val MnSOD com os marcadores oxidativos, inflamatórios, apoptóticos e de dano ao DNA, bem como, com os níveis de BDNF, ACh e atividade da AChE, memória e a capacidade funcional de pacientes após-AVE crônico isquêmico (AVEi) crônico. Quarenta e oito pacientes com AVE e 50 controles saudáveis foram submetidos a questionários, exames laboratoriais e testes clínicos. Os resultados mostraram uma maior proporção do genótipo VV nos pacientes após-AVE em comparação com indivíduos saudáveis. Os pacientes com genótipo VV também apresentaram níveis mais elevados de 2'-7' diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA), nitrito/nitrato (NOX), fator de necrose tumoral- α (TNF- α), acetilcolinesterase (AChE), caspase 8 (CASP 8), caspase 3 (CASP 3) e PicoGreen (PG), bem como, níveis diminuídos de BDNF e ACh. Similarmente, nos testes cognitivos (memória de trabalho e memória total) e nos testes motores (Escala de Equilíbrio de Berg e o teste fitness sênior - STF), os pacientes com genótipo VV tiveram piores resultados quando comparados com os outros genótipos (grupo AVE e controles). Desta forma, os resultados sugerem uma relação do polimorfismo da MnSOD Ala16Val com as rotas oxidativa/nitrosativa e inflamatória, culminado na ativação da cascata apoptótica e dano a DNA, especialmente para aqueles pacientes com genótipo VV. Além disso, os pacientes (VV) mostraram os piores resultados nos testes cognitivos e motores, assim como, níveis reduzidos de BDNF, ACh e atividade da AChE. Assim, é plausível propor que pacientes com AVEi com genótipo VV apresentam um pior desempenho em relação à função cognitiva e motora, assim como, aumento nos parâmetros oxidativos e inflamatórios. Nossos achados também relacionaram as alterações clínicas aos níveis reduzidos de BDNF e ACh, sugerindo que o conhecimento da existência do polimorfismo é importante para avaliar os mecanismos moleculares associados à lesão neurovascular e oferecer um tratamento individualizado para esses pacientes.

Palavras-Chave: Acidente Vascular Encefálico, Estresse Oxidativo, Inflamação, Apoptose, Dano ao DNA, Memória, Funcionalidade.

ABSTRACT

Doctor Tese

Graduating Program in Toxicological Biochemistry

Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

The role of the Ala16Val Mn-SOD polymorphism in chronic stroke: a clinical study

Author: Eduardo Tanuri Pascotini

Advisor: Michele Rechia Figuera

Co-advisor: Luiz Fernando Freire Royes

Date and place of defense: UFSM, Santa Maria, RS. August 17^o, 2019

Considered one of the most common neurological diseases, stroke has a high morbidity and mortality, and corresponds to 85% of disease cases. Several factors are involved in disease etiology, such as changes in vascular permeability, oxidative stress, inflammation, apoptosis and DNA damage. Among the main consequences are cognitive and motor deficits, depending on the level and time of injury. The single nucleotide polymorphism Ala16Val (SNP) is a genetic mutation of the antioxidant enzyme superoxide dismutase and is associated with the risk factors of metabolic and vascular diseases, such as stroke. Brain derived neurotrophic (BDNF) is a neurotrophin that, among various functions, is associated with tissue regeneration after cerebrovascular lesions. Acetylcholine (ACh) is a neurotransmitter related to mnemonic processes, learning and motor functions. Thus, this study was to investigate the relationship between the polymorphism Ala16Val with oxidative, inflammatory, apoptotic and DNA damage markers, as well, with levels of BDNF, ACh, memory and functional capacity of chronic stroke patients. Forty-eight ischemic stroke patients with and fifty healthy controls were subjected to questionnaires, laboratory tests and clinical trials. The results showed a higher proportion of the VV genotype in stroke patients compared to healthy individuals. VV genotype patients also showed higher levels of 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA), nitrite/nitrate (NOX), tumor necrosis factor- α (TNF- α), acetylcholinesterase (AChE), caspase 8 (CASP 8), caspase 3 (CASP 3) and PicoGreen (PG), as well as decreased levels of BDNF and ACh. Similarly, in cognitive tests (working memory and total memory) and tests (Berg Balance scale and the senior fitness test-STF), VV genotype patients had worse results when compared with the other genotypes (stroke and control groups). In this way, the results suggest a relationship of polymorphism Ala16Val with oxidative/nitrosative and inflammatory routes, culminated in activation of the apoptotic cascade and DNA damage, especially for VV genotype patients. Moreover, VV patients showed worst results in cognitive and motor tests, as well as low BDNF and ACh levels. Thus, it is plausible to suggest that VV patients present a worse performance in relation to cognitive and motor function, as well as increase in oxidative and inflammatory parameters. Our findings also related clinical changes reduced levels of BDNF and ACh, suggesting that knowledge of Mn-SOD polymorphism is important to evaluate the molecular mechanisms associated with neurovascular lesion and offer a individualized treatment for these patients.

Key-Words: Stroke, Oxidative Stress, Inflammation, Apoptosis, DNA Damage, Memory, Functionality.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Tabela 1.....	13
Figura 1.....	12
Figura 2.....	13
Figura 3.....	15
Figura 4.....	16
Figura 5.....	22

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
Akt	Proteína Quinase B
Apaf-1	Fator-1 de Ativação de Protease Apoptótica
ATP	Adenosina Trifosfato
AVDs	Atividades de Vida Diárias
AVE	Acidente Vascular Encefálico
AVE _i	Acidente Vascular Encefálico Isquêmico
AVE _h	Acidente Vascular Encefálico Hemorrágico
BDNF	Fator Neurotrófico Derivado do Encéfalo
BHE	Barreira Hemato Encefálica
CAD	DNase Ativada por Caspases
CAT	Catalase
CASP 8	Caspase 8
CASP 3	Caspase 3
CASP 9	Caspase 9
Cu ⁺¹	Cobre
DCF	Diclorofluorosceína
DCFH	Diclodihidrofluoroscerina
DCFDA	Diacetato de Diclorofluorosceína
ERs	Espécies Reativas
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
Fe ⁺¹	Ferro
ERNs	Espécies Reativas de Nitrogênio
GCT	Alanina
GP _x	Glutathione Peroxidase
GSH	Glutathione Redutase
GTT	Valina
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HBA1C	Hemoglobina glicada 1 ^a

IMC	Índice de Massa Corporal
IL-1 β	Interleucina 1-Beta
IL-6	Interleucina – 6
LTP	Potenciação de Longa Duração
mBDNF	BDNF maduro
MnSOD	Superóxido Dismutase Manganês
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintase
NOx	Nitrito/nitrato
O ₂ ⁻	Ânion Superóxido
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONOO ⁻	Peroxinitrito
PARP	Poly ADP Ribose Polimerase
PG	Picogreen
PI3K	3-fosfatidilinositida quinase
RLs	Radicais Livres
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superóxido Dismutase
STF	Teste Fitness Sênior
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa

Sumário

LISTA DE FIGURAS E TABELAS	7
LISTA DE ABREVIATURAS	8
1.INTRODUÇÃO	12
2.OBJETIVOS	27
2.1 Objetivo Geral	27
2.2 Objetivos Específicos	27
3.ARTIGOS CIENTÍFICOS	29
3.1 Manuscrito 1 - Brain-Derived Neurotrophic Factor levels are lower in Chronic Stroke patients: a relation with MnSOD ALA16VAL SNP through TNF-α and caspases pathways	30
3.2 Manuscrito 2 - MnSOD Ala16Val polymorphism is related to motor and cognitive impairment in stroke patients: BDNF and acetylcholine involvement	51
4.DISSCUSSÃO	72
REFERÊNCIAS	79
ANEXOS	93

APRESENTAÇÃO

No item **INTRODUÇÃO** está descrita uma revisão de literatura sobre os temas abordados nesta tese.

Os resultados que fazem parte desta tese estão sob a forma de manuscrito, os quais se encontram no item **ARTIGO CIENTÍFICO** (manuscrito 1 e 2). As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas encontram-se nos respectivos manuscritos e representam a íntegra deste trabalho.

Os itens **DISCUSSÃO** e **CONCLUSÃO** da tese apresentam interpretações e comentários gerais sobre os manuscritos científicos contidos no final neste trabalho.

O item **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** refere-se somente as citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO** e **DISCUSSÃO** desta tese.

O item **ANEXOS** refere-se ao questionário clínico utilizado neste estudo, aos testes físicos aplicados, assim como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e o Termo de Confidencialidade.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Acidente Vascular Encefálico

O AVE trata-se de um bloqueio parcial ou total, de forma súbita da circulação sanguínea no encéfalo (NORRVING e KISSELA, 2013), que pode ser causada por uma oclusão embólica ou trombótica da artéria cerebral, o que caracteriza o AVE isquêmico (AVEi), ou por um extravasamento de sangue através de um vaso sanguíneo rompido, caracterizando o AVE hemorrágico (AVEh) (Figura 1) (WOODRUFF et al., 2011).

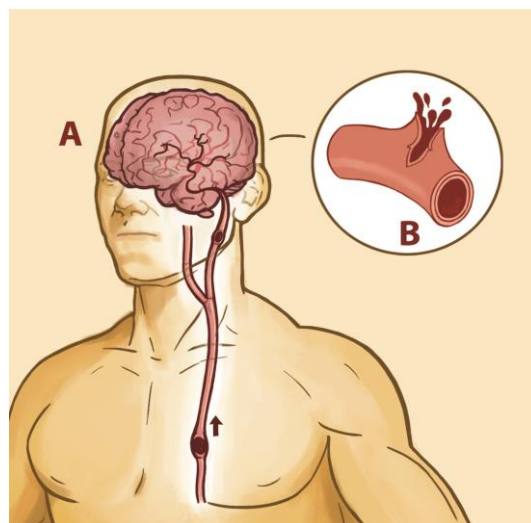


Figura 1- AVE Isquêmico e Hemorrágico. Figura ilustrando a isquemia cerebral por placa aterosclerótica, seja por formação local ou êmbolo, caracterizando o AVE isquêmico (A) e o AVE hemorrágico (B) quando há ruptura vascular. AVE – Acidente Vascular Encefálico. Criado por Matheus Pascotini.

Entre os fatores associados para o AVE estão relacionados os modificáveis (MOHD ZULKIFLY et al., 2016) e os não modificáveis (GOLDSTEIN et al., 2011), sendo o primeiro relacionado aos hábitos de vida e o segundo a questões genéticas e temporais, sendo que, estes fatores são múltiplos e combinados (Tabela 1), demonstrando a heterogeneidade da doença. Ainda, segundo Schmidt e colaboradores (2011), passados seis meses do acometimento do AVE, a patologia pode ser considerada crônica.

NÃO MODIFICÁVEIS	MODIFICÁVEIS
IDADE	DOENÇAS CARDÍACAS
SEXO	<i>DIABETE MELLITUS</i>
ETNIA/RAÇA	CONSUMO EXCESSIVO DE ÁLCOOL
HISTÓRIA FAMILIAR DE AVE/AIT	ESTENOSE ASSINTOMÁTICA DA CARÓTIDA
	HIPERTENSÃO
	FUMO
	SEDENTARISMO
	OBESIDADE
	FIBRILAÇÃO ARTERIAL
	DISLIPIDEMIA

Tabela 1: Principais fatores associados para o AVE.

Entre as principais sequelas motoras pós-AVE estão a diminuição da força muscular, incoordenação motora e hipertonia espástica no lado contralateral à lesão (Figura 2) (FRANCISCO et al., 2006), resultando em perda da funcionalidade, através de distúrbios da marcha, perda do equilíbrio, incapacidade ou limitação para realização das atividades de vida diárias (AVDs) (BRUCK et al., 2000; MARTINS et al., 2004; NUNES e QUEVEDO, 2004). Além disso, pesquisas demonstram efeitos danosos a processos cognitivos pós-AVE, como a capacidade de funcionamento executivo, velocidade de processamento de informações e memória (DASSONVILLE et al., 2016; HIMI et al., 2016).

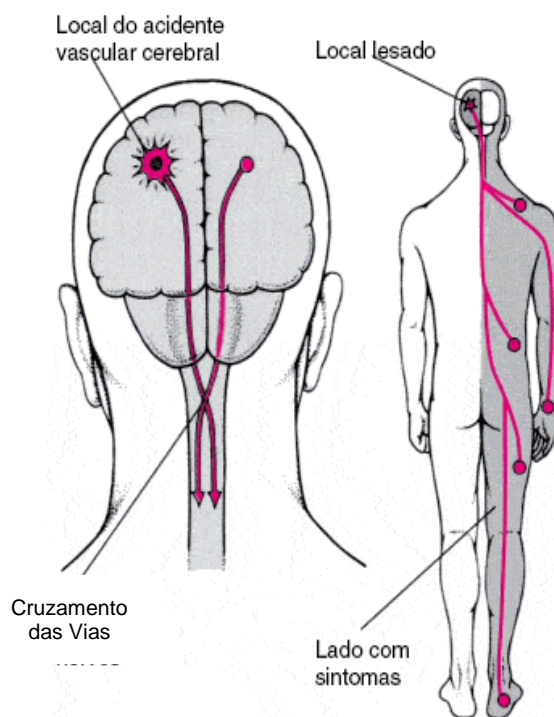


Figura 2- Sintomas de AVE. Figura ilustrando o local do acometimento do AVE e as consequentes respostas físicas no lado contralateral em razão do cruzamento dos nervos em nível de tronco cerebral. Criado por Matheus Pascotini.

Segundo a OMS (2010), o AVE é a terceira maior causa de mortalidade no mundo e a maior em termos de perda de funcionalidade e capacidade físico-motora. Já no Brasil, segundo Garritano, et al (2012), dados recentes apontam que o AVE é a causa mais frequente de óbitos na população em adultos, e, entre aqueles pacientes que sobrevivem, 70% não retornam ao seu trabalho e 30% necessitam de auxílio para caminhar e realizar as AVDs (BELDA-LOUIS et al., 2011).

1.2 Patofisiologia

No AVEi, há a formação de duas regiões dentro do território isquêmico, um território nuclear central e outra região que envolve essa área central, que é a zona de penumbra isquêmica (KUMAR et al., 2010). Nesta zona de penumbra a ausência de oxigênio é suficiente para levar à redução elétrica, sem despolarizar a membrana neuronal. O fluxo e o metabolismo oscilam entre condições adversas e possíveis, ocorrendo a viabilidade do tecido (FANN et al., 2013).

Inicialmente após a isquemia cerebral ocorre a hipoperfusão, que, conseqüentemente gera uma insuficiente oferta de glicose e oxigênio ao cérebro, induzindo à falha bioenergética tanto pelo bloqueio ou pela redução da produção de adenosina trifosfato (ATP) (HERTZ et al., 2007; ROSSI et al., 2007). Esta depleção energética interrompe os processos dependentes de ATP, começando pela Na^+/K^+ -ATPase, resultando na falha do controle do gradiente iônico das membranas, e, conseqüentemente, aumentando o influxo de Na^+ , Cl^- e Ca^{2+} para dentro das células (MORO et al., 2005).

É nesta região de penumbra, que por ainda haver disponibilidade de glicose e oxigênio dos vasos sanguíneos colaterais, geralmente resulta um diferente tipo de morte celular, dependente de pouca energia, a apoptose (BROUGHTON et al., 2009). Nesse sentido, as alterações clínicas relacionadas com o AVEi, podem ser causadas por vários mecanismos, entre os principais podemos citar a falha energética celular, a excitotoxicidade, o estresse oxidativo,

a sinalização apoptótica, assim como, os processos inflamatórios (SHICHITA et al., 2012; ZHANG et al., 2012).

Outro agente com importante papel na patogênese do dano cerebral é a liberação excessiva de glutamato, ou a excitotoxicidade glutamatérgica (CULMSEE e KRIEGLSTEIN, 2005). A despolarização anóxica nos neurônios causa a abertura dos canais de cálcio voltagem-dependentes no terminal pré-sináptico e permite um influxo de Ca^{2+} , induzindo a liberação descontrolada de glutamato na fenda sináptica. Além disso, a despolarização de neurônios adicionais, causando o influxo de Ca^{2+} e liberação de glutamato, leva a amplificação do insulto isquêmico inicial, e, somados a isto, a geração de RLs e outras espécies oxidantes, podem destruir organelas e a membrana plasmática, contribuindo para a disfunção da barreira hemato-encefálica e o edema tecidual (MORO et al., 2005; BREDER et al., 2000; MONGIN, 2007).

O estresse oxidativo, caracterizado como um desequilíbrio entre as defesas antioxidantes e agentes oxidantes (SIES, 1997), tem um importante papel na patofisiologia do AVEi (CHERUBINI et al, 2005; SAMSON et al, 2005). O aumento na produção de espécies reativas (ER) como o ânion superóxido (O_2^-) pode levar a formação de ER adicionais, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxil (OH^\cdot) e peroxinitrito (ONOO^-) (HEEBA e EI-HANAFY, 2012). Além disso, esta produção aumentada de ER, podem culminar na ativação de citocinas pró-inflamatórias como a interleucina-1 β (IL-1 β) e a interleucina 6 (IL-6) e também do TNF- α , o que, acabará potencializando o aumento da peroxidação lipídica e causando disfunção vascular e danos proteicos e ao DNA (BANATI et al, 1993; ROTHWELL et al, 1997). (Figura 3).

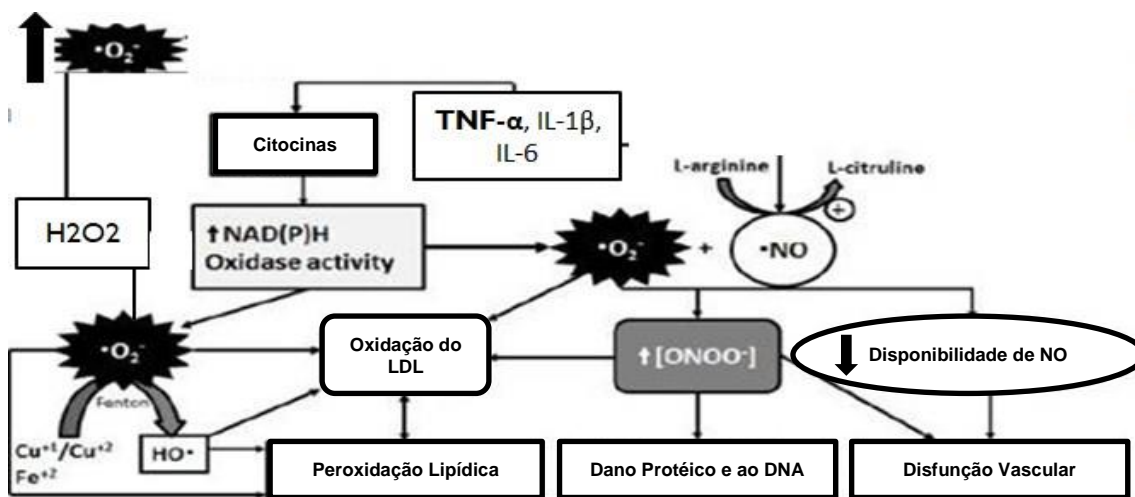


Figura 3- Patofisiologia do AVE. Figura demonstrativa do processo de acúmulo de espécies reativas, como o ânion superóxido, após o acometimento do AVE, o que leva ao aumento de ER adicionais como o peróxido de hidrogênio, o radical hidroxil e o peroxinitrito. Posteriormente levando à ativação de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 β e a IL-6 e também do TNF- α , culminando no aumento da peroxidação lipídica e causando disfunção vascular e danos proteicos e ao DNA. Elaborado pelo Autor.

Adicionalmente, muitos estudos também descrevem a participação da via inflamatória na patofisiologia do AVE (CHAMORRO e HALLENBECK, 2006; PANDYA et al., 2011) e esta resposta inflamatória pode contribuir para o dano isquêmico cerebral (CHAMORRO e HALLENBECK, 2006). Após o AVEi, as células microgliais são ativadas rapidamente em resposta a este evento (NAKAJIMA E KOHSAKA, 2001) e esta ativação induz a produção de citocinas inflamatórias, incluindo o TNF- α , o que aumenta o dano tecidual (BANATI et al., 1993; ROTHWELL et al., 1997).

Após a ligação do TNF- α , seus receptores podem ser interligados levando a ativação das caspases iniciadoras, como a CASP 8, seguido da ativação das caspases executoras, como a CASP 3, por meio da via apoptótica extrínseca (SCHNEIDER-BRACHERT et al., 2004), assim como desencadeia a ativação da caspase 9 (CASP 9) (executora), na via apoptótica intrínseca, (GROSS et al., 1999) por meio da clivagem dos membros da família dos fatores pró-apoptóticos Bcl-2 para iniciar o processo apoptótico induzido pela mitocôndria culminando no dano celular (GRAHAM, 2001; SUGAWARA, 2004). Além disso, a resposta inflamatória parece também estar envolvida na liberação e regulação de várias moléculas no sistema nervoso central, como fatores de crescimento e neurotrofinas (SAHA et al., 2006). (Figura 4).

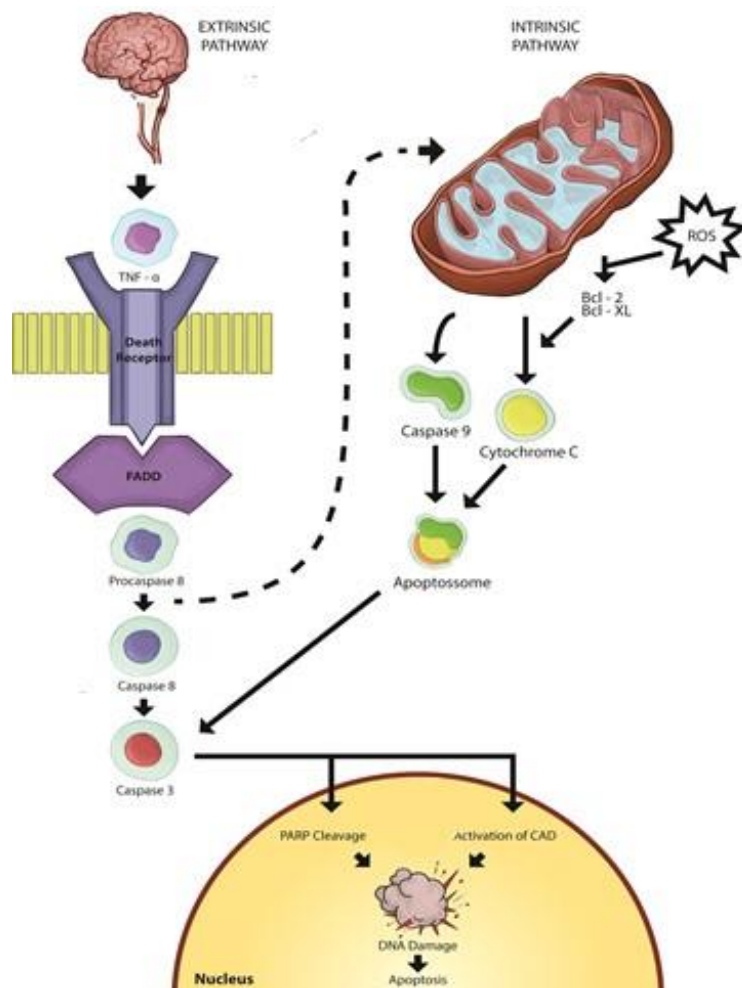


Figura 4- Cascata Inflamatória e Apoptótica após o AVE. Rota apoptótica extrínseca e intrínseca seguida da isquemia cerebral. Após a isquemia cerebral (1) ocorrem repostas inflamatórias sistêmicas e focais. Após a liberação de citocinas inflamatórias, entre elas o TNF- α , que liga-se ao receptor de morte na membrana celular e, através de um adaptador molecular (FADD), ativa a pró-caspase 8 que, por sua vez, ativa a CASP 8 (iniciadora) e a CASP 3 (executora) (3), clivando a PARP e ativando a CAD, e, culminando no dano ao DNA e morte celular (rota extrínseca). A CASP 8 também, juntamente com a produção aumentada de ROS, é capaz de ativar uma proteína pró-apoptótica (BID) que desregula o poro de transição permeável da membrana, permitindo a liberação do citocromo c, que juntamente a caspase 9 formarão o apoptossoma, e então ativarão a CASP 3, e a apoptose prossegue assim como na rota extrínseca (rota intrínseca). Criado por Matheus Tanuri Pascotini (2015).

1.3 Biomarcadores de estresse oxidativo e inflamação

A importância das espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) na fisiopatologia de diversas doenças neurológicas já foram demonstradas em diversos estudos (CHAN, 2001; BENEDICTO et al., 2008; NAI-WEN et al., 2014). Estas ERs não têm, necessariamente, um desmembramento na camada de valência (DROGE,

2002), diferentemente dos RL, que são átomos ou grupo de átomos que contém um ou mais elétrons desemparelhados (SOUTHORN E POWIS, 1988).

Enquanto existentes, estas espécies buscam estabilidade reagindo com a matéria circundante, e, desta maneira causam danos às membranas celulares, proteínas e DNA (AMES et al., 1994). Os RLs são altamente reativos com moléculas como o DNA e os lipídios, pareando com seus elétrons e causando oxidação destas moléculas (DROGE, 2002). Diversas EROs e suas derivadas são geradas após o AVE, sendo o O_2^- , o H_2O_2 , e a mais reativa de todos, o OH^- . O O_2^- é formado na mitocôndria, a partir da aquisição de um elétron adicional pelo oxigênio, deixando a molécula com um elétron desemparelhado somente (CHAN, 2001).

Enzimas pró-oxidantes como a xantina oxidase e NADPH oxidase também catalisam a geração de O_2^- , sendo que este pode reagir com o NO e produzir o $ONOO^-$, este um radical fortemente reativo que causa disfunção proteica (BECKMAN et al., 1990). O OH^- é produzido através do H_2O_2 por uma reação envolvendo o cobre (Cu^{+1}) ou ferro (Fe^{+2}) no processo conhecido como reação de Fenton, assim como, a partir da união de O_2^- e H_2O_2 na reação de Haber-Weiss, ou ainda, a partir do $ONOO^-$ (BECKMAN et al., 1990; CHAN, 1996).

Enquanto níveis fisiológicos de ER podem ser eliminados por um sistema antioxidante enzimático e não-enzimático eficiente (NAVARRO e BOVERIS, 2008), nos casos de desequilíbrio na produção destas espécies, a ação deste sistema se torna comprometida (HALLIWELL e WHITEMAN, 2004). Embora as EROs apresentem papéis fisiológicos relevantes, o aumento das concentrações que levam ao estresse oxidativo têm sido relacionado a várias condições patológicas (SIMS e MUYDERMAN, 2010) como o AVE (PASCOTINI et al., 2015). Isto ocorre principalmente devido ao cérebro ser especialmente propenso a danos mediados pelas espécies reativas, que está relacionado ao alto consumo de O_2 , ácidos graxos poli-insaturados e presença de metais de transição, e a redução das defesas antioxidantes (LESZESK et al., 2016).

Entre as enzimas componentes do sistema de defesa antioxidante, a superóxido dismutase (SOD), a glutathiona peroxidase (GPx), glutathiona redutase (GSH) e a catalase (CAT) fazem parte das enzimáticas, assim como a

glutationa reduzida, e vitaminas A, C, D e E são parte das não-enzimáticas (HALLWELL e GUTTERIDGE, 1995; CHAN, 2001), e a SOD tem o papel de degradar o O_2^- em H_2O_2 , o qual será posteriormente convertido em água (H_2O). (NELSON et al, 2006; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

A SOD (EC1.15.1.1) é uma metaloenzima que desempenha importante papel, já que catalisa a dismutação do radical superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular. O H_2O_2 , por sua vez, é degradado pela CAT ou GSHPx, resultando em água e O_2 . Existem três classes de SOD, dependendo de sua localização e do metal componente: SOD1, SOD2 e SOD3. (ZELKO e MARIANI, 2002).

A SOD Cobre/Zinco (SOD1) é uma enzima dimérica codificada pelo gene humano da SOD1, necessita de cobre e zinco como cofatores e é encontrada no citosol ou no meio extracelular. A SOD dependente de Manganês (MnSOD ou SOD2) requer manganês para exercer sua atividade e é encontrada na mitocôndria (NELSON et al., 2006; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007; CHEN et al., 2011). A SOD3 é uma enzima extracelular dependente de cobre e zinco: é a mais recente descoberta dessa família de enzimas, possui um peso molecular de 135.000 Da e uma das suas características é a sua alta afinidade pela heparina. Além disso, SOD3 foi primeiramente detectada em plasma humano, linfa, ascites e fluido cerebroespinal e o padrão de expressão dessa enzima é altamente restrito a células e tecidos específicos, em que a sua atividade pode exceder a da SOD1 e MnSOD (ZELKO E MARIANI, 2002).

Dentre os métodos utilizados na mensuração da produção de H_2O_2 , um, baseado na fluorescência do DCFDA, está sendo reaplicado para mensuração de EROs na mitocôndria. O princípio do método se baseia na detecção das EROs sendo proporcional a um aumento nos níveis basais, o que emite uma intensa fluorescência verde, somente após a desacetilação e consequente oxidação, predominantemente, mas não exclusivamente, do H_2O_2 (ESPOSTI, 2002). O DCFDA adentra as células e acumula principalmente no citosol. Para evitar citotoxicidade, as células devem ser preparadas com o DCFDA em baixas concentrações (BINDOKAS et al., 2003). O produto fluorescente, diclorofluorosceína (DCF), pode ser quantificado precisamente por calibrações padrão (ESPOSTI, 2002).

O NO desempenha importante papel no sistema biológico, atuando como uma molécula mensageira mediadora de diversas funções, incluindo vasodilatação, inibição de agregação plaquetária, neurotransmissão, aprendizado e formação da memória (MIRANDA, 2001). O NO reage com EROs e moléculas biológicas como o O_2^- , para formar diversos produtos, entre eles o nitrito e o nitrato, metabólitos do NO endógeno acessíveis para análise quantitativa (ROMITELLI, 2007). A mensuração dos produtos finais do NO, NO_x , são comumente utilizados para mediar a produção do NO (TATSCH, 2011).

Em resposta a quadros inflamatórios, infecciosos e outras mudanças ambientais, ocorre a liberação do TNF- α , que é uma potente molécula pró-inflamatória, produzida por diversos tipos celulares incluindo os macrófagos, monócitos, linfócitos e fibroblastos (BAUND e KARIN, 2001). O TNF- α medeia a ativação de diversos fatores de transcrição levando a um aumento na expressão genética (HERBEIN e KHAN, 2008). A ligação do TNF- α aos seus receptores pode ativar diferentes vias sinalizadoras, entre elas, a via apoptótica (PARK e BOWERS, 2010). Sabe-se que o TNF- α é uma citocina altamente prejudicial no AVE, estando envolvida na expansão do infarto cerebral (BARONE et al., 1997).

Alguns estudos já demonstraram que o processo inflamatório é dirigido por várias citocinas, entre elas o TNF- α , sendo que as suas concentrações vem se mostrando bastante elevadas em pesquisas envolvendo indivíduos pós-AVE (FERRARESE et al., 1999; AL-BAHRANI et al., 2007), Da mesma forma tem sido proposto que o TNF- α é uma importante molécula efetora na apoptose, na liberação do citocromo *c* e ativação da CASP 3 (BRADHAM et al., 1998; TAFANI et al., 2000).

A AChE, uma enzima envolvida em funções imunes, é expressa nos linfócitos T e promove a hidrólise da ACh para colina e acetato. Esta tem função anti-inflamatória, pela supressão da produção de citocinas pró-inflamatórias (KAWASHIMA e FUJI, 2003; SKOK et al., 2007). Alguns estudos demonstram uma ligação entre as rotas inflamatórias e a sinalização colinérgica (METZ e TRACEY, 2005; SHAKED et al., 2009). Especificamente, as vias colinérgicas anti-inflamatórias inibem a síntese e liberação de citocinas

através da ativação do receptor de ACh (HEJMADI et al., 2003). Já foi demonstrado uma inter-relação entre as reações inflamatórias e a capacidade de hidrólise de ACh, sugerindo que o aumento nesta capacidade induzida pelo estresse pode acentuar a resposta inflamatória ao AVE. A via anti-inflamatória colinérgica pode ser atenuada pela atividade da AChE, através da hidrólise e inativação da ACh, e é modulada em danos inflamatórios (KAUFER et al., 1998).

As citocinas inflamatórias elevadas podem, por si só, causar danos neurológicos, e, conseqüentemente, a atividade da AChE pode refletir a intensidade da resposta neuroinflamatória em pacientes que sofreram AVE (ASSAYAG et al., 2010). Ainda, pode antagonizar a sinalização colinérgica vagal em nível dos macrófagos. (Ofek, et al. 2007; Shaked, et al., 2009), promovendo um efeito inflamatório sistêmico (aumento do TNF- α) a uma resposta apoptótica (ativação das CASP 8 e 3). De fato, níveis aumentados de TNF- α podem exacerbar a ligação com seus receptores e levar à ativação das caspases executoras como a CASP 8, através da rota apoptótica extrínseca. (MICHEAU and TSCHOPP, 2003; SCHNEIDER-BRACHERT et al., 2004).

1.4 Biomarcadores de apoptose e dano ao DNA

Diferente da necrose, a apoptose trata-se de uma morte celular programada, com mecanismos regulatórios complexos e diferenças morfológicas. O seu papel na homeostase tecidual é extremamente importante, porque um desequilíbrio em sua regulação pode ter resultados fatais. A apoptose por estar envolvida com patologias oncogênicas, autoimunes e degenerativas, incluindo a isquemia cerebral. Duas rotas executoras contribuem para a apoptose: a rota extrínseca e a rota intrínseca. Cada uma delas contém componentes dependentes ou independentes das caspases (ZHANG et al., 2004). Este processo se dá através de cisteínas proteases, as caspases, que são divididas em classe iniciadora e classe executora da apoptose. Os membros da classe de caspases iniciadoras são as caspases-1, -2, -5, -8, -9, -10, -11 e -12. As caspases executoras são as caspases-3, -6 e -7 (DEGTEREV et al., 2003).

Dentro da rota apoptótica dependente das caspases, a via extrínseca é iniciada pela ligação dos receptores de morte celular. Esta ligação resulta na formação do complexo sinalizador de morte, o qual contém múltiplas moléculas adaptadoras. A CASP 8 então é ativada, e recruta diretamente as caspases-3 e -7, e a rota apoptótica extrínseca prossegue (LIOU et al., 2003; ZHANG et al., 2004).

A partir da clivagem de uma classe de proteínas anti-apoptóticas, a rota mitocondrial é estimulada e a via intrínseca de apoptose é iniciada. Esta via inicia com o aumento da permeabilidade mitocondrial externa, o que leva ao extravasamento de determinadas proteínas mitocondriais, incluindo o citocromo c. A ativação consequente da caspase-9, iniciadora, ativa novamente as caspases executoras -3 e -7 e a apoptose segue, resultando na morte celular (GRAHAM, 2002; LIOU et al., 2003).

Desta forma, as análises quantitativas das CASP 8 (iniciadora) e CASP 3 (executora), podem ser importantes indicativos de morte celular programada após AVEi (ZHANG et al., 2004) (Figura 4).

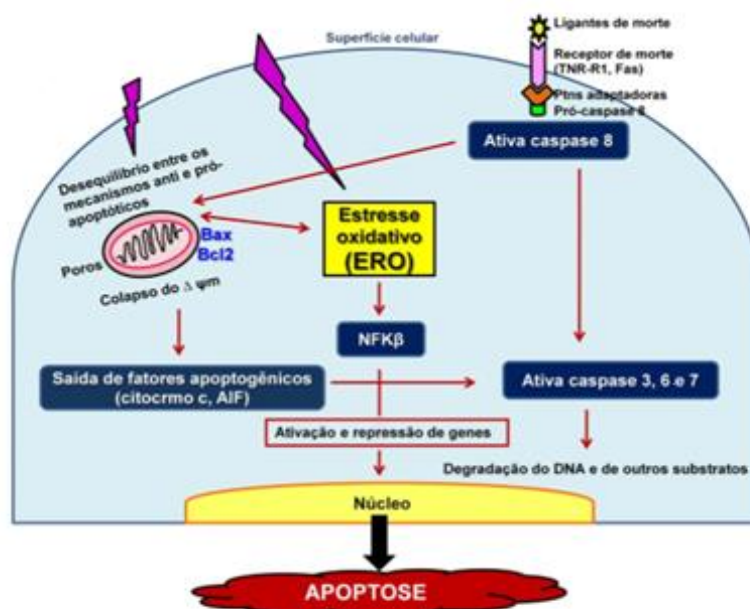


Figura 5- Indução da apoptose pelo aumento da geração de ERO intracelular. Quando ERO aumentam no interior da célula ocorre o estresse oxidativo, alterações nas membranas mitocondriais, dissipação do potencial de membrana mitocondrial, liberação dos fatores

apoptogênicos para o citoplasma, culminando com a ativação da cascata das caspases e apoptose. Adaptado de Andrade et al. (2011)

O tecido celular sofre mudanças em razão de determinados processos fisiológicos e patológicos, e estas mudanças são, geralmente, estimadas através da mensuração do conteúdo de DNA (HUNKIZER, 1992). A quantificação dos ácidos nucleicos é um passo crucial em muitas aplicações diagnósticas e biológicas. Diversos ensaios estão disponíveis para quantificação do DNA solúvel, porém poucos são específicos e sensíveis para DNA dupla fita como o PG (VITZTHUM et al., 1999). Este método de quantificação apenas emite fluorescência quando se liga com o DNA dupla fita, diferenciando-se da maioria de outros ensaios onde a afinidade pelo DNA e RNA diminuem suas especificidades (HÁ et al., 2011).

O método de quantificação do PG tem uma sensibilidade de 20 a 400 vezes maior que outros ensaios conhecidos como Hoechst 33258, YO-PRO-1 com corante cianina monomérico e YOYO-1 com corante cianina dimérico, utilizando um fluorímetro padrão (SINGER et al., 1997).

1.5 Fator Neurotrófico Derivado do Encéfalo – BDNF

De acordo com McAllister (1999), o BDNF é um membro da família das neurotrofinas, sendo o fator neurotrófico mais distribuído no encéfalo, que tem um papel essencial na plasticidade e regeneração neuronal em doenças neurodegenerativas. Além disso, é responsável pela modulação da plasticidade do sistema nervoso central durante a aprendizagem e a recuperação das habilidades motoras (HELM et al., 2016). Nestas situações, os níveis de BDNF diminuem, com um aumento paralelo de substâncias pró-inflamatórias, como o TNF- α . (NAGATSU e SAWADA, 2005). Além disso, o BDNF pode passar a barreira hemato-encefálica em situações como o AVE, e exercer uma ação protetora no local da lesão durante a fase aguda pós-isquêmica (LAZZARO et al., 2007), assim podendo reduzir os riscos do AVE pelos seus efeitos neurotróficos e vasculares (NAVARATNA et al., 2011 ; PIKULA et al., 2013).

A expressão do BDNF também apresenta uma relação com o decréscimo da função cognitiva pós-AVE e, posteriormente, com sua recuperação em fases mais tardias (HIMI et al, 2016). Alguns estudos

mostraram que o decréscimo nos níveis de BDNF correlacionam-se positivamente com déficits de memória em doenças neurodegenerativas (LI et al., 2009; ERICKSON et al., 2010), entre elas o AVE (ZHANG et al., 2012). Os mecanismos que permitem plasticidade neuronal pós-AVE são semelhantes aos que promovem a reorganização neuronal no encéfalo durante a aprendizagem saudável (KLEIM e JONES 2008; MURPHY e CORBETT 2009).

O papel do BDNF na plasticidade neuronal é dependente da estimulação e liberação da forma madura do BDNF (mBDNF). A forma madura do BDNF se tornou um importante alvo de pesquisas em plasticidade neural relacionados com o aprendizado, secundário ao seu papel na mediação da indução e manutenção da potenciação de longa duração (LTP) (LU et al., 2008).

Finalmente, seu transporte através da barreira hemato encefálica (BHE) não ocorre em condições normais, porém, em casos como o AVE, sim. E, esta migração de BDNF através da BHE, pode ser importante durante a fase de pós-isquêmica, podendo ter uma ação protetora no local da lesão (LAZZARO, 2007).

1.6 Acetilcolina - ACh

A ACh atua com função anti-inflamatória, pela supressão da produção de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α , e atua na regulação de funções vitais como a memória, o aprendizado e o movimento (KAWASHIMA e FUJI, 2003) e a AChE é uma enzima envolvida em funções imune, expressa nos linfócitos T, que promove a hidrólise da ACh para colina e acetato, sendo, entre outros, considerada uma enzima pró-inflamatória (SKOK et al., 2007).

A ACh pode melhorar a codificação das memórias pela influência dos *inputs* aferentes ao córtex, fazendo com que os circuitos corticais respondam ao estímulo sensorial, enquanto diminui o *feedback* excitatório mediante retroalimentação. Estas mudanças dinâmicas resultam da potencialização dos inputs aferentes nocotínicos, e da inibição do *feedback* excitatório dos neurônios pré-sinápticos muscarínicos (HASSELMO, 2006).

1.7 Polimorfismo MnSOD Ala16Val

A MnSOD é uma molécula homotetramétrica composta por tetrâmeros de aproximadamente 23 quilodaltons (kDa) por subunidade. É uma enzima

antioxidante considerada como primeira linha de defesa codificada por um gene nuclear e é encontrada na sua forma ativa na matriz mitocondrial (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; BRESCIANI et al., 2013). A SOD2 uma das três isoformas desta enzima antioxidante, (CHEN et al, 2011), contém um gene com 5 exons e está localizada no cromossoma 6q25 (ROY et al, 2006). Um dos mais comuns polimorfismos da MnSOD é devido a substituição da alanina 16 (GCT) com a valina (GTT), resultando no polimorfismo Ala16Val. (Figura 6).

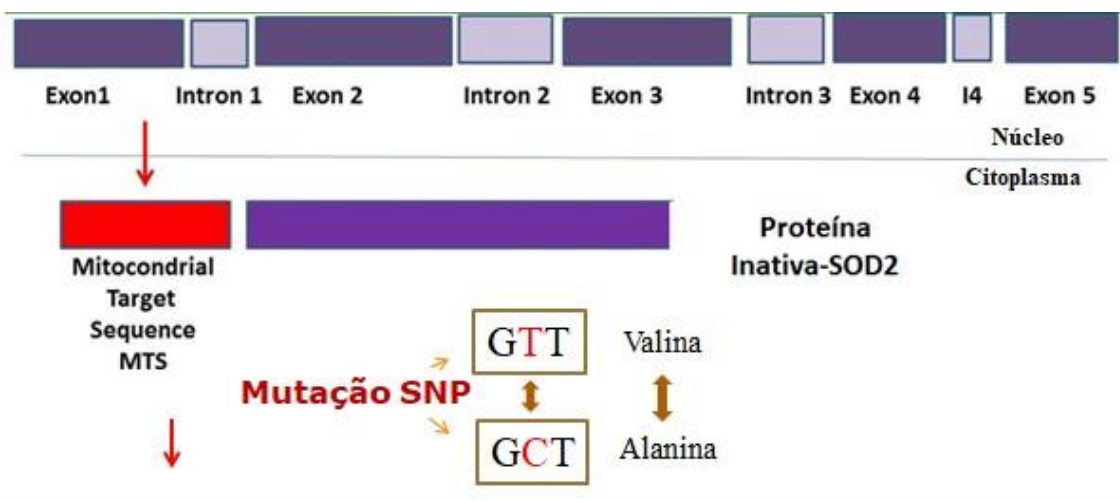


Figura 6- Estrutura da SOD 2 e Polimorfismo Ala16Val Mn-SOD. A SOD2 contém um gene com 5 exons e está localizada no cromossoma 6q25. Um dos mais comuns polimorfismos da MnSOD é devido a substituição da alanina 16 (GCT) com a valina (GTT), resultando no polimorfismo Ala16Val.

Esta mutação pode refletir em uma redução funcional da enzima em nível mitocondrial, o que implicaria em uma eficiência diminuída da MnSOD (COLLINSON et al, 2006), sendo que, segundo Peacock e Morris (2006), a Ala-MnSOD demonstrou uma maior efetividade no controle da geração de O_2^- mitocondrial em relação à mutação Val-MnSOD. (Tabela 2).

Alelo	Genótipo	Aminoácido	Estrutura da Proteína	Eficiência Enzimática
A	AA	Alanina	Alfa-Hélice	40% maior
A/V	AV	Alanina/Valina	Helicoidal	Intermediária
V	VV	Valina	Beta-Lâmina	Baixa

Tabela 2 – Estruturas e características dos genótipos do Polimorfismo Ala16Val Mn-SOD.

Ainda, sobre esta mutação, Palmirotta et al (2015) investigaram possíveis associações com a migração e sugeriram que este polimorfismo pode

ser a causa de desequilíbrio oxidativo associado à depressão cortical, causando uma superestimulação dos neurônios trigêmeinais e aumento da dor. Apesar desta mutação ser bastante comum, outros polimorfismos podem estar associados ao AVE, como o Met66Val, resultando em aumento nos riscos de complicações após cirurgias vasculares, especialmente para os pacientes que possuem o alelo Met. (WESTBROEK et al., 2012).

1.8. Alterações cognitivas pós-AVE

O AVE é responsável por um significativo declínio cognitivo em 1/3 dos pacientes que sofrem a patologia (SUN et al., 2014), sendo que o risco destes déficits ocorrerem futuramente aumenta de 5 à 8 vezes para estes pacientes (QU et al., 2015). Embora os mecanismos envolvidos neste déficit cognitivo não estejam totalmente estabelecidos, as lesões em áreas como o hipocampo, substância branca e o córtex cerebral contribuem para esta patogênese (SUN et al., 2004).

Estes déficits podem afetar a capacidade dos pacientes em viver independentemente, mesmo após certa recuperação dos danos físicos, assim como o risco de outros acometimentos da doença aumentam, além da evolução para demência ou até mesmo o aumento no risco de mortalidade (CHANDER et al., 2015). Estes danos podem envolver dificuldades na fala, entendimento e compreensão, memória, processamento de informações, raciocínios simples e complexos (SUN et al., 2004).

Existem terapias farmacológicas e não farmacológicas para o tratamento destes déficits (BAHAR et al., 2013; STRAUBMEIER et al., 2017) sendo que a segunda se mostra mais efetiva para os casos de danos considerados de baixo a moderado impacto (OLAZARÁN et al., 2010; STRAUBMEIER et al., 2017). A reabilitação cognitiva é considerada uma destas terapias não farmacológicas, a qual promove a melhora destes déficits através de diferentes rotas, como o aumento nos fatores de crescimento (GOMÉZ-PINILLA et al., 1998; KESSLAK et al., 1998; HINDLE et al., 2013).

Neste sentido, a administração de fatores de crescimento como o BDNF, tem demonstrado capacidade em potencializar a função cognitiva tanto em condições fisiológicas quanto patológicas, e, junto da ACh, têm sido alvo de pesquisas e interesse no sentido de buscar a compreensão de seus papéis

nesta reabilitação, bem como a importância clínica que podem exercer para futuros prognósticos nesta patologia (YOUNG et al., 2015; HARRIS et al., 2016).

1.9. Alterações motoras pós-AVE

Déficits nas funções motoras são consequências comuns após o acometimento do AVE, sendo que 75% dos sobreviventes à esta patologia apresentam disfunções motoras como a diminuição da força muscular, incoordenação motora e hipertonia espástica no lado contralateral à lesão que persistem para a fase crônica da doença, levando a perda da funcionalidade e comprometendo a qualidade de vida destes pacientes (GRESHAM et al., 2004). Durante os 6 primeiros meses após o AVE, alguma recuperação motora espontânea ocorre (JORGENSEN et al., 1995), porém, as melhoras futuras dependerão de um programa de reabilitação motora. O processo de reabilitação motora é uma forma de aprendizado motor (WARRAICH e KLEIM, 2010), o qual refer-se a uma mudança no comportamento motor por prática ou experiência. (SCHMIDT e LEE, 2005). Desta forma, é importante que os indivíduos que sofreram o AVE, engajem em um programa de reabilitação motora, para reaprender habilidades e capacidades que foram perdidas ou afetadas graças a patologia. (MANG et al., 2013).

Este aprendizado, ou reaprendizado, motor dá-se por um processo chamado de neuroplasticidade (WARRAICH e KLEIM, 2010), que é definida pela capacidade do sistema nervoso central (SNC) em realizar mudanças na estrutura e funcionalidade neuronal em resposta a novas experiências. (KLEIM e JONES, 2008). Inicialmente, o aprendizado relacionado à plasticidade envolve o fortalecimento dos neurônios existentes, bem como a formação de novas conexões neurais que darão suporte à este aprendizado (WARRAICH e KLEIM, 2010; HOSP e LUFT, 2011).

Esta neuroplasticidade pode ser detectada através de técnicas como estimulação cerebral não invasiva, para medir mudanças no tamanho, local e nos mapas de excitabilidade motora cortical, e a ressonância magnética funcional, que mede as alterações na ativação e recrutamento nas regiões encefálicas envolvidas com o movimento (WARRAICH e KLEIM, 2010).

Alguns estudos mostram a relação bioquímica, assim como os aspectos cognitivos e a funcionalidade, em fases agudas do AVE, porém são escassos os trabalhos que enfatizaram seus estudos na fase crônica da doença (PASCOTINI et al., 2015). Da mesma forma, não se tem descrito na literatura investigações a respeito da associação do polimorfismo genético da Ala16Val MnSOD no AVE.

Nesse sentido, torna-se importante avaliar se existe uma relação entre o polimorfismo genético da MnSOD Ala16Val com as alterações clínicas, assim como, com marcadores oxidativos, inflamatórios e apoptóticos na fase tardia do AVE. O esclarecimento da relação desse genótipo na doença neurovascular poderá auxiliar em um melhor conhecimento da patologia e em possíveis ferramentas diagnósticas e de tratamento para a população acometida.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Avaliar a relação entre o polimorfismo genético da Ala16Val MnSOD com os testes cognitivos e motores, assim como a relação com os marcadores oxidativos, inflamatórios e BDNF em pacientes após-AVE isquêmico crônico.

2.2 Objetivos Específicos

Comparar entre os pacientes após AVE com indivíduos saudáveis os seguintes parâmetros, entre os diferentes genótipos do polimorfismo da Ala16Val MnSOD:

- Descrever as características da população em estudo em relação à idade, sexo, índice de massa corporal (IMC) e o polimorfismo genético da Ala16Val MnSOD, assim como fatores associados ao AVE como hipertensão arterial, diabetes, dislipidemia, tabagismo e sedentarismo.
- Investigar os níveis séricos de nitrito e nitrato (NOx) e de diacetato de 2'-7'-diclorofluorosceína (DCFDA).
- Analisar os níveis séricos do TNF- α e BDNF.
- Analisar as atividades séricas da ACh e AChE.

- Avaliar a cascata apoptótica, através da ativação das caspases 9, 8 e 3 séricas.
- Investigar os possíveis danos ao DNA por meio do teste de PicoGreen em leucócitos.
- Avaliar os diferentes tipos de memória.
- Analisar a capacidade funcional, por meio das valências físicas de equilíbrio, marcha, força de membros superiores (MMSS) e membros inferiores (MMII) e espasticidade.
- Correlacionar os marcadores oxidativos, inflamatórios e apoptóticos, os níveis de BDNF, testes de memória e a capacidade funcional dos pacientes após-AVE.

3. Artigos Científicos

3.1 Manuscrito 1

NCBI Resources How To Sign in to NCBI

PubMed
U.S. National Library of Medicine
National Institutes of Health

Advanced

Format: Abstract

Send to

J Stroke Cerebrovasc Dis. 2018 Nov;27(11):3020-3029. doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2018.06.032. Epub 2018 Aug 25.

Brain-Derived Neurotrophic Factor Levels are Lower in Chronic Stroke Patients: A Relation with Manganese-dependent Superoxide Dismutase ALA16VAL Single Nucleotide Polymorphism through Tumor Necrosis Factor- α and Caspases Pathways.

Pascolini MET¹, Flores DAE², Kepler MA¹, Konzen MV³, Fornari MAL³, Arend MJ², Gabbi MP⁴, Gobo MLA⁵, Bochi DGV⁴, Prado DALC⁶, de Carvalho DLM⁵, Duarte DMMME⁴, da Cruz DIBM⁴, Moresco DRN⁴, Dos Santos DARS⁴, Royes DLEF⁷, Fighera DMR⁸.

Author information

Abstract
The manganese-dependent superoxide dismutase (MnSOD) Ala16Val single nucleotide polymorphism (SNP) has shown to be associated to risk factors of vascular diseases. Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) plays an essential role in the plasticity and neuronal regeneration of the brain after vascular injuries. However, little is known about interaction between MnSOD Ala16Val SNP on stroke, a frequent neurologic disease that involves various interacting pathways, such as vascular dysfunctions, inflammation, and neurotrophic factors. In this sense, the objective of this study was to investigate the relationship between MnSOD Ala16Val SNP with BDNF levels on stroke and also its influence on nitrosative stress, inflammatory, apoptotic, and DNA damage parameters. For this, 88 subjects were investigated, 44 subjects poststroke and 44 healthy controls. Questionnaires were applied to clinical characteristics and after laboratorial exams were collected. We analyzed levels of oxidative/nitrosative stress, inflammatory, apoptotic, and DNA damage markers. We showed a higher proportion of VV genotype in poststroke as compared to healthy subjects. Nitrite/nitrate, Tumor Necrosis Factor- α , Caspase 3 (CASP 3) and 8 (CASP 8) activation, Acetylcholinesterase (AChE), and Pilocgreen levels were higher in VV poststroke group, as well as BDNF and ACh levels were lower in VV and AV poststroke. We may suggest that V allele carries a worse outcome profile after stroke, relating to nitrosative stress, inflammatory, and apoptotic response. These events associated to a BDNF reduction, probably, contribute to the appearance or reincidence of stroke.

Copyright © 2018. Published by Elsevier Inc.

KEYWORDS: Apoptosis; BDNF; Inflammation; MnSOD Ala16Val polymorphism; Stroke

Full text links
ELSEVIER
FULLTEXT ARTICLE

Save items
Add to Favorites

Similar articles
Involvement of MnSOD Ala16Val polymorphism in epilepsy: A relationship with seizu [Gene. 2019]
ALA16VAL-MnSOD gene polymorphism and stroke: Association with dyslipidemii [Gene. 2017]
Association of the Ala16Val MnSOD gene polymorphism with plasma leptin lev [Gene. 2015]
Review The effects of rosuvastatin on lipid-lowering, inflammat [Pharmacogenomics J. 2016]
Review Meta-Analysis on the Association between Brain-I [J Stroke Cerebrovasc Dis. 2018]
See reviews...
See all...

Related information

Brain-Derived Neurotrophic Factor levels are lower in Chronic Stroke patients: a relation with MnSOD ALA16VAL SNP through TNF- α and caspases pathways

Eduardo Tanuri Pascotini^{a,b}, Ariane Ethur Flores^{a,d}, Aline Kegler^{a,b}, Vivana Konzen^a, Ana Letícia Fornari^a, Josi Arend^{a,d}, Patricia Gabbi^d, Luciana Assis Gobo^f, Guilherme Vargas Bochi^d, Ana Lucia Cervi Prado^e, Leandro Machado de Carvalho^f, Marta M. M. F. Duarte^d, Ivana B. M da Cruz^d, Rafael Noal Moresco^d, Adair Roberto Soares dos Santos^d, Luiz Fernando Freire Royes^{b,c,d}, Michele Rechia Fighera^{a,b,c,d*}

^a*Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Neuropsiquiatria, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil*

^b*Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil.*

^c*Centro de Educação Física e Desportos, Laboratório de Bioquímica do Exercício (BIOEX), Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil.*

^d*Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil.*

^e*Serviço de Fisioterapia, Hospital Universitário de Santa Maria, RS, Brazil*

^f*Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil.*

*Michele Rechia Fighera, MD, PhD

Centro de Ciências da Saúde

Departamento de Neuropsiquiatria

Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil

FAX: 55 55 3220 8018

e-mail: mrfighera@yahoo.com.br

Abstract

The MnSOD Ala16Val single nucleotide polymorphism (SNP) has shown to be associated to risk factors of vascular diseases. Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) plays an essential role in the plasticity and neuronal regeneration of the brain after vascular injuries. However, little is known about interaction between MnSOD Ala16Val SNP on stroke, a frequent neurologic disease that involves various interacting pathways, such as vascular dysfunctions, inflammation, and neurotrophic factors. In this sense, the objective of this study was to investigate the relationship between MnSOD Ala16Val SNP with BDNF levels on stroke and also its influence on nitrosative stress, inflammatory, apoptotic and DNA damage parameters. For this, eighty-eight subjects

were investigated, 44 subjects post-stroke and 44 healthy controls. Questionnaires were applied to clinical characteristics and after laboratorial exams were collected. We analyzed levels of oxidative/nitrosative stress, inflammatory, apoptotic and DNA damage markers. We showed a higher proportion of VV genotype in post-stroke as compared to healthy subjects. Nitrite/nitrate (NO_x), Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α), Caspase 3 (CASP 3) and 8 (CASP 8) activation, Acetylcholinesterase (AChE) and Picogreen (PG) levels were higher in VV post-stroke group, as well as BDNF and ACh levels were lower in VV and AV post-stroke. We may suggest that V allele carriers present a worse outcome profile after stroke, relating to nitrosative stress, inflammatory and apoptotic response. These events associated to a BDNF reduction, probably, contribute to the appearance or reincidence of stroke.

Key-Words: MsSOD Ala16Val Polymorphism, Stroke, BDNF, Inflammation, Apoptosis.

INTRODUCTION

Stroke is an important disease with a high rate of morbidity and mortality [1]. Ischemic stroke accounts for 85% of all cases [2] and leads to functional impairments, with 15% to 30% of the patients presenting permanently disabled [3].

In stroke, there is a complex cascade of molecular and cell mechanisms involved in ischemic cell death and are characterized by bioenergetic failure, excitotoxicity, oxidative stress and inflammation [4, 5], beyond cytotoxicity mediated by cytokines and cell death pathways activation [6]. In ischemic stroke, there is a formation of two target areas, a nuclear central area and a penumbra area around the central. In this second area, what still maintain oxygen and glucose biodisponibility, usually occurs a different cell death, known as apoptosis [7].

Oxidative and nitrosative stress is a condition where there is an imbalance between the production of reactive species (RS) and elimination of these by the antioxidant system [8]. These RS can cause damage to lipids, proteins and DNA, leading to a cascade of events wich may result in apoptosis activation [9,10].

One of major defenses against to RS production is a family of oxidoreductases known as superoxide dismutase (SODs) [11]. The manganese-dependent superoxide dismutase (MnSOD or SOD2) is one of three isoforms of this antioxidant enzyme [12] that contains a gene with five exons and is located on chromosome 6q25 [13]. One of the most common polymorphisms of MnSOD is due to replacement of alanine 16

(GCT) to valine (GTT), resulting in the polymorphism Ala16Val. This mutation can reflect in a functional enzyme reduction at mitochondrial level, which would imply a decreased efficiency of the MnSOD, being that the Ala-MnSOD has demonstrated a greater effectiveness in the control of generation of RS in relation to Val-MnSOD [14]. Also, about this mutation, Palmirotta et al (2015) [15] investigated possible associations with migraine and suggested that SOD2 polymorphism may cause a defective control of the oxidative phenomena linked to cortical spreading depression, the neurophysiological hallmark of migraine aura, causing an overstimulation of trigeminal neurons and pain triggering. Despite this mutation be quite common, some others polymorphisms could be associated with stroke, as the Met66Val where there is a methionine substitution for a valine, resulting in increased risk of poor results after vascular surgery, particularly for patients Met-MnSOD [16].

Additionally, many studies also have described the participation of inflammation in the stroke pathophysiology [17,18]. In fact, stroke induces the release of TNF- α , a potent pro-inflammatory molecule, produced by various cell types including macrophages, monocytes, lymphocytes and fibroblasts [19]. The binding of TNF- α receptors can activate different signaling pathways, among them, the apoptotic pathway [20], through CASP 8 and CASP 3 activation [21,22], leading to DNA damage [23,24].

ACh is a neurotransmitter with anti-inflammatory properties, since it is able to suppress the production of pro-inflammatory cytokines [25], while AChE is an enzyme, expressed in T cells and is involved in immune function, promoting the hydrolysis of ACh to choline and acetate [26]. Recent studies have demonstrated a link between inflammatory pathways and cholinergic signaling, suggesting that cholinesterase activity would reflect the intensity of the neuroinflammation in stroke patients [27].

BDNF is a member of the neurotrophin family that plays an essential role in the plasticity and neuronal regeneration of the brain after acute stroke [28]. The BDNF also enhances the repair of DNA damage [29] and regulates antioxidant enzymes in neurons [30], suggesting the involvement of this neurotrophin with the oxidative stress and subsequent inflammation. Another study has shown that BDNF can be a powerful inhibitor of apoptosis-induced cell death [31]. However, the BDNF levels decrease with a parallel increase of pro-inflammatory substances in some chronic neurological diseases [32].

Although ALA16VAL MnSOD SNP is related with various diseases [33], studies of its association with the late phase of stroke are still to be performed. This

way, the aim of this study was to investigate a relationship between the BDNF and the MnSOD Ala16Val SNP on the late phase stroke and its influence on increase of oxidative/nitrosative stress and TNF- α by extrinsic apoptotic pathway activation.

We propose that lower BDNF levels in stroke patients may be associated to MnSOD Ala16Val SNP by a process involving an increase of nitrosative stress, TNF- α and caspases (3 e 8). Thus, the knowlegment of these processes is crucial importance to evaluate molecular mechanisms related to neurovascular injury and improve the clinic status and life quality of these patients.

MATERIAL AND METHODS

Study population

We performed a case-control study with eighty-eight participants that were divided into two groups: control group (44 healthy participants) and the chronic [34,35] ischemic stroke group (53 post-stroke participants). At first, participants were evaluated using a questionnaire. From the initial 53 ischemic stroke patients, 44 were selected according the following exclusion criteria: 1) systolic/diastolic blood pressure at rest $\geq 180/100$ mmHg, 2) rest heart rate ≥ 100 bpm and/or 3) alterations in two or more of the following parameters in the last three months: transaminases (TGO, TGP), gamma-glutamyl transferase GGT, alkaline phosphatase, prothrombin time (TP), RNI, KTTTP, albumin, bilirubin, creatinine, sodium, potassium, ionic calcium, urea, VSG, protein C reactive and hemogram (including leukocyte count).

To analyze risk factors for stroke, internal medicine specialists diagnosed hypertension, diabetes mellitus, and dyslipidemia. Hypertension was diagnosed if subjects were taking antihypertensive agents or had a systolic blood pressure of ≥ 140 mm Hg or diastolic blood pressure of ≥ 90 mm Hg. Diabetes mellitus was diagnosed if subjects were taking oral anti-hyperglycemic agents or insulin or if their fasting blood glucose level was ≥ 100 mg/dl. Dyslipidemia was diagnosed if subjects were taking dyslipidemia medication or had a serum low-density lipoprotein cholesterol level of < 40 mg/dl, a triglyceride level of ≥ 150 mg/dl, or a high-density lipoprotein cholesterol level of ≥ 160 mg/dl. Smoking status was recorded as non-smoker or current smoker (if they had quit at least 6 months before). The study protocol was approved by the local institutional review boards at the authors' affiliated institution. Informed consent was obtained from all the subjects or their legal surrogates (number 10555912.3.0000.5346). The work described has been carried out in accordance with The Code of Ethics of the

World Medical Association (Declaration of Helsinki).

Biochemical analyses

Blood samples were collected after 12 h overnight fasting by venous puncture into gray, purple, green and red top Vacutainers[®] tubes (BD Diagnostics, Plymouth, UK) with sodium fluoride, EDTA, heparin or no anticoagulants, respectively. Plasma with sodium fluoride was used to measure the levels of fasting glucose and serum was used to AChE, CASP (8 and 3), total, HDL and LDL cholesterol, urea, creatinine, TGO, TGP, and alkaline phosphatase. Plasma with EDTA was used to 2'-7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) and ACh. Tube with heparin to dosage DNA damage, trough PG. Anticoagulants tubes were used to dosage serum levels of NOx. These concentrations were measured using standard enzymatic methods by the use of Ortho-Clinical Diagnostics[®] reagents on a fully automated analyzer (Vitros 950[®] dry chemistry system; Johnson & Johnson, Rochester, NY, USA). Plasma EDTA was used to quantify glycated hemoglobin A1C (HbA1C) through the Bio-Rad Variant II system, with HPLC by ionic change.

Oxidative/nitrosative stress markers

The ROS level was determined using the non-fluorescent cell permeating compound 2' 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) assay [36]. The 2'-7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) is a reagent that easily crosses the cell membrane and has been deacetylated on by esterase enzymes, forming 2',7'-diclorodihydrofluorescein (not fluorescent), which in the presence of reactive oxygen species (ROS), mainly hydrogen peroxide, is oxidized to 2',7'-dichlorofluorescein solution that emits fluorescence. After the incubation period, this will be performed on your reading device fluorimeter to 488 nm excitation and emission 525 nm. Determination of serum levels of nitrite/nitrate (NOx) [37]. NOx was measured by the modified Griess method using the Cobas Mira automated analyzer. All incubations were at 37 °C and results were expressed in $\mu\text{mol/L}$. NOx was measured by the modified Griess method using the Cobas Mira automated analyzer as follows: 50 μL of sample was pipetted into the reaction cuvette and 50 μL of VCl_3 was added to reduce nitrate to nitrite after 25 s. Thus, 50 μL of Griess reagent was added. The mixture sample/ VCl_3 /Griess reagent was incubated for 20 min and read at 550 nm. All incubations were at 37 °C and results were expressed in $\mu\text{mol/L}$. Imprecision was

studied using two controls at concentrations of 50 and 100 $\mu\text{mol/L}$. The intra-assay (within-run) precision was assessed with 10 replicate assays of each control in two analytical runs. Inter-assay (between-run) precision was assessed by analyzing duplicate assays for each of the two controls on four different days. Accuracy of the method was determined by replicate analysis using five determinations of four concentration levels of standard solution of sodium nitrate (10, 45, 90, 150 $\mu\text{mol/L}$) added to serum samples within a single run. Instrument carry-over was assessed using 10 replicate assays of the two controls (control 1: 50 $\mu\text{mol/L}$ and control 2: 100 $\mu\text{mol/L}$) run repeatedly in the following sequence (control 1, control 2, control 1, control 2...) within a single analytical run.

TNF- α determination

The TNF- α quantification was assessed by ELISA using commercial kits for human (eBIOSCIENCE, San Diego, USA), according to manufacturer's instructions. The BD OptEIA™ test is a solid phase sandwich ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). It utilizes a monoclonal antibody specific for TNF coated on a 96-well plate. Standards and samples are added to the wells, and any TNF present binds to the immobilized antibody. The wells are washed and a streptavidin–horseradish peroxidase conjugate mixed with a biotinylated anti-human TNF antibody is added, producing an antibody–antigen–antibody “sandwich”. The wells are again washed and TMB substrate solution is added, which produces a blue color in direct proportion to the amount of TNF present in the initial sample. The Stop Solution changes the color from blue to yellow, and the microwell absorbances are read at 450 nm.

ACh determination

The determination of acetylcholine was assessed by LC-MS, the Agilent Technologies 1260 Infinity chromatography with automatic injection and mass detector Agilent Technologies Triple quadrupole 6430 [38]. The chromatographic column used for determination was a column Poroshell Column 3.0 x 100 mm 2.7 μm particle size. Solvents used were acetonitrile degree LC-MS, Chromasolv and LC-MS degree acetic acid, Sigma-Aldrich.

Elution Isocratic condition has been established consisting of in 75% of the eluent (0.1%) acetic acid and 25% of Eluent B (acetonitrile). The retention time was 3

minutes. The injection volume was 5 μ L and chromatographic flow of 0.6 mL/min. The chromatographic column was maintained at 23 $^{\circ}$ C during the race.

ESI source conditions were tested and optimized in the following values: temperature of 350 $^{\circ}$ C, gas flow: 10 L/min, nebulizer pressure of 15 psi and capillary voltage of 4000 v. Mass transitions used to determine the parent and product ion have been tested and selected transitions were: 146.1 to 87.1 quantifier ion m/z and 146.1 to 60.2 qualifier ion m/z. Applying these parameters optimized the chromatogram below was obtained for the determination of acetylcholine

AChE enzyme determination

The enzyme AChE concentration was measured in serum by standard enzymatic methods using Ortho-Clinical Diagnostics $^{\circledR}$ reagentes in an automated analyzer (Vitros 950 $^{\circledR}$ dry chemistry system; Johnson & Johnson, Rochester, NY). Acetylcholine and butyrylcholine iodide are the substrates of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. The stained product formed (tiocolina) reacts with the acid 5-5'-ditiobis-(2-nitrobenzóico) or DTNB, a reagent of the thiol (-SH) groups, forming a yellow colored compound (5-tio-2 nitrobenzoic or TNB). To measure acetylcholinesterase, we used 2.55 mL of buffer, 100 μ L of DTNB, 200 μ L of sample serum and 50 μ L of etrozapine, which is a butyrylcholinesterase inhibitor. After incubation for 5 min, 100 μ L of substrate was obtained for activity measure. Cholinesterase activity is expressed in international units (under the test conditions, 1 U = 1 μ mol \times min $^{-1}$ \times mL $^{-1}$) and it is estimated through the absorbance variation over time (follow the variation in absorbance at 412 nm during 5 min) in relation to its reference tube (inhibitor of butyrylcholinesterase). The absorbance reading was held at the Shimadzu Spectrophotometer 700 nm, UV-1601, Japan.

Caspase determination

CASP 8 and 3 activities were determined by Assay Kits, Fluorimetric (BioVision, Mountain View, CA). Activation of ICE-family proteases/ caspases initiates apoptosis or other cellular processes in mammalian cells. The Caspases/ICE Fluorometric Assay Kit provides a simple and convenient means for assaying the activity of caspases that recognize the sequence YVAD. The assay is based on detection of cleavage of substrate YVAD-AFC (AFC: 7-amino-4-trifluoromethyl coumarin). YVADAFC emits blue light (λ_{max} =400 nm); upon cleavage of the substrate by

caspsases, free AFC emits a yellowgreen fluorescence ($\lambda_{\max} = 505 \text{ nm}$), which can be quantified using a fluorometer or a fluorescence microtiter plate reader. Comparison of the fluorescence of AFC from a treated sample with an untreated control allows determination of the fold increase in caspase activity. The activity of caspsases were calculated as fluorescence intensity (FI)/min/mL= $\Delta FIt / (t \times v)$, where ΔFIt =difference in fluorescence intensity between time zero and time t minutes, t = reaction time in min, and v = volume of sample in ml.

Cell-free DNA

The cell-free DNA was measured through the Picogreen assay. The Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Reagent (Quant It™, Invitrogen, Brazil) is a fluorescent reagent ultra-sensible for double strand DNA (dsDNA) quantification in solution, which can detect at very small concentrations of DNA (up to 25 pg/mL). This assay can be used for dsDNA quantification in the bloodstream due to cell apoptosis and to genotoxicity when pure DNA molecule is exposed to a particular compound [39].

BDNF quantification

The BDNF serum quantification was be measured by ELISA from commercial kit for BDNF measurement in humans (eBIOSCIENCE, San Diego, USA), according to the factory instructions and homocysteine levels measured by the Immulite Analyzer (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, California).

MnSOD Ala16Val genotyping

Genomic DNA was isolated from peripheral blood leukocytes using a DNA Mini Kit Purification (Mo Bio). MnSOD Ala16Val SNP was detected by PCR-RFLP [40]. PCR amplifications were performed in a total volume of 50 μl containing 5 μl of 10 \times buffer, 1 μl of 25 mM MgCl_2 , 1.25 μl of 10mM dNTP, 0.5 μl of Taq Polymerase (Gibco Inc, Co.), 1 μl of each primer (40 pmol), 3 μl of genomic DNA (0.25 μg), and 34.5 μl of ddH₂O. The amplification primers (Gibco Inc, Co.) for a 110-bp fragment of the human MnSOD gene were 5'-ACCAGCAGGCAGCTGGCGCCGG-3' (sense strand) and 5'-GCGTTGATGTGAGGTTCCAG-3' (antisense strand) with the following thermocycler parameters: an initial cycle of 95 °C for 5 min followed by 35 cycles at 95 °C for 1 min and 61 °C for 1 min. The final cycle was followed by an extension period of 2 min at 72 °C. The PCR product (10 μl) was digested with Hae III (15 U; 37 °C, 6 h,

Gibco. Inc, Co.). Digested products (23 and 85 bp) were visualized on a 4% agarose gel (Amersham Biosciences Inc, Co.) stained with ethidium bromide. A mutation was introduced by a primer mismatch to create a restriction cut site for Hae III in the -9 codon, and the following genotypes were observed: -9Ala/Ala (23 and 85 bp); -9Ala/Val (23, 85 and 110 bp); and -9Val/Val (110 bp).

Statistical Analysis

Data were expressed as the mean \pm error of the mean (SEM). At first, allele frequencies were estimated using the gene-counting method. Chi square analysis was used to estimate the Hardy–Weinberg equilibrium. Then, data were analyzed by unpaired *t* test, or two-way ANOVA when appropriated. A second analysis compared stroke and control participants with different Ala16Val MnSOD genotypes (AA, VV and AV) using the analysis of variance followed by the Bonferroni *post hoc* test. A multivariate analysis using logistic regression (Backward ald odel) was also performed to observe the potential influence of sex and age. Correlation analyses were carried out using the Pearson's correlation coefficient. Statistical analyses were performed using the SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, version 22, Chicago, USA) software in a PC-compatible computer. Significance was set at $P \leq 0.05$.

Results

Table 1 lists the baseline characteristics of the study subjects, where can be observed the approximate average age and gender distributions, and that there were no significant differences in the percentage of smokers. In relation to the average BMI ($p < 0.0001$) and the percentage of hypertensive ($p < 0.0001$), sedentary ($p < 0.05$), glucose ($p < 0.001$), cholesterol ($p < 0.0001$), LDL ($p < 0.001$) and triglycerides ($p < 0.001$) it was possible to observe significant differences between the control group and the stroke group.

In Figure 1 we can observe the genotype distribution, according to the chi-square analysis, with differences between the control group and stroke group in AA genotype, being higher frequency in the control group, and in the VV genotype, being higher frequency in stroke group ($\chi^2 = 8.523$; $p < 0.05$).

In Figure 2 are represented DCF and NOx levels. Firstly, is possible to observe that there was no difference regarding the DCF in comparison between groups or among genotypes. In relation to NOx, there was no difference between the stroke group and the

control group regardless of genotype [F (2.74) = 45.74; $p < 0.001$]. Then, using a *post-hoc* analysis, we observed larger values of the VV stroke group in relation to AV ($t = 4.678$; $p < 0.05$) and AA ($t = 4.346$; $p < 0.05$) stroke group.

In Figure 3 are shown the results regarding TNF- α (A), AChE (B) and ACh (C). In the first graph, the statistical analysis showed that the stroke group showed increased levels of TNF- α when compared to the control group, regardless of the genotype [F (2.74) = 5.932; $p < 0.001$] and that, in the *post-hoc* analysis, the stroke group VV showed higher levels than the AA ($t = 7.648$; $p < 0.001$) and AV ($t = 6.636$; $p < 0.001$) stroke and control groups. In relation to AChE levels, we observed a significant increase in the AV [F (2.74) = 2.859; $p < 0.05$] and VV [F (2.74) = 4.050; $p < 0.001$] stroke group as compared to the control group, as well as in respect of the VV stroke group with AV ($t = 4.171$; $p < 0.05$) and AA ($t = 5.308$; $p < 0.01$) stroke groups. Finally, in relation to ACh levels, the stroke group, in all genotypes showed lower values compared to the control group [F (2.74) = 4.246; $p < 0.05$] and *post-hoc* analysis showed that VV stroke group presented lower values in relation to AV ($t = 4.427$; $p < 0.05$) and AA ($t = 9.836$; $p < 0.001$) stroke groups, as well as the AV stroke group when compared to AA stroke group ($t = 4.732$; $p < 0.05$).

The activity levels of CASP 8 and 3, and the PG quantification are shown in Figure 4. In relation to the activities of CASP 8 and 3, we have observed higher levels in stroke group compared to control in the genotype AV [F (2.74) = 6.623; $p < 0.001$] and VV from CASP 8 [F (2.74) = 12.35; $p < 0.001$] as well as in relation to genotype AV [F (2.74) = 5.687; $p < 0.001$] and VV of CASP 3 [F (2.74) = 10.56; $p < 0.001$]. Still, the VV stroke group demonstrated higher levels than AV ($t = 14.32$; $p < 0.001$) and AA ($t = 25.20$; $p < 0.001$) stroke groups, as well as the AV stroke group when compared to AA stroke group ($t = 9.277$; $p < 0.001$) in relation to CASP 8, and high values in the comparison of VV stroke group with the AV ($t = 13.62$; $p < 0.001$) and AA ($t = 22.10$; $p < 0.001$) stroke group related to CASP 3 after *post-hoc* analysis. About PG quantification levels, we observed higher values in the stroke group compared to the control group, regardless of the genotype [F (2.74) = 53.95; $p < 0.0001$]. Yet, when comparisons were made between the genotypes through *post-hoc* analysis in the stroke group, VV group presented higher values compared to the AV and AA groups ($t = 4.332$; $p < 0.05$).

In Figure 5, are represented the results of BDNF quantification levels. On initial analysis, whereas the comparison of stroke and control group we can observe lower

levels of the first against the second, regardless of genotyping [$F(2.74) = 77.73$; $p < 0.0001$]. Then, using a *post-hoc* analysis, we observed lower values of the VV stroke group in relation to AV ($t = 5.883$; $p < 0.01$) and AA ($t = 15.98$; $p < 0.001$) stroke groups, as well as in the comparison between the AV stroke group with the AA stroke group ($t = 8.942$; $p < 0.001$). Finally, in relation to BDNF levels, the AA control group presented higher values compared to the AV ($t = 11.31$; $p < 0.001$) and VV ($t = 10.94$; $p < 0.001$) control groups.

Discussion

According to results we show that the VV genotype was more prevalent in stroke group, suggesting that this polymorphism can be associated with this disease. Similarly, patients with VV genotype showed lower BDNF levels, as well as higher AChE, TNF- α , nitrosative stress, caspases (-8 and -3) activation and DNA damage. To our knowledge, this is the first study to investigate the influence of the MnSOD Ala16Val and BDNF in chronic stroke and its relation with the increase of nitrosative stress and TNF- α , culminating in activation of extrinsic apoptotic pathway and DNA damage.

Recent studies have indicated that there is a close relationship between MnSOD and BDNF [41]. The treatment with BDNF increased MnSOD expression and reduced cellular apoptosis in human angiogenic cells. The same authors found that the NF κ B inhibition reduced BDNF regulation in the MnSOD expression, indicating that the NF κ B signaling may contribute, at least in part, to the increase in MnSOD activity [41].

In addition, these findings also suggest a relationship between BDNF and inflammation, since NF κ B activation may occur by TNF- α modulation [42]. According, TNF- α can act in their respective receptors [43] and cause the activation of NF κ B, promoting intracellular calcium concentrations, as well as the production of RS [44,45] in stroke patients [46].

Studies showed that inefficient antioxidant defenses, as the MnSOD, potentiates the cerebral infarction after ischemia [47] and that the MnSOD Ala16Val polymorphism is associated with an increased risk of vascular disease [48]. In fact, the MnSOD has been considered an effective therapeutic target in preventing ischemic [47], and our results corroborate with that idea since between individuals with stroke, prevailed the VV genotype, being possible that the accumulation of RS can lead to a destabilization

of the inflammatory pathway and promote the activation of caspases, such as caspases-8 and -3 [49,50], resulting DNA damage.

Mitochondrial stability changes, resulting in the release of proteins, are essential for the activation of the apoptotic pathway, through the CASP 3, which in turn induces cellular damage, such as DNA fragmentation [51,52]. In addition, the O_2^- activate caspases in different tissues such as liver and endothelial cells [53,54], and has its activity inhibited by the action of SOD. In the present study, we have seen the increase in caspases 8 and 3 in VV stroke group, probably due to a mitochondrial destabilization and an increase in the release of inflammatory factors, which may cause cell damage and induce apoptosis [55].

In fact, inflammation is a complex response to injuries, such as body tissue damage, pathogens, ischemia, autoimmune damage, among others [56]. The O_2^- have pro-inflammatory roles, causing lipid peroxidation and oxidation, DNA damage, forming the ONOO- and recruiting neutrophils [57-59]. In this way, by its action eliminating the O_2^- , the MnSOD can be considered also as an anti-inflammatory enzyme [60].

Importantly, the MnSOD expression is regulated in areas of inflammation by RS and pro-inflammatory mediators [61,62]. This inflammatory modulation positively regulates the expression of MnSOD, which in turn negatively regulates inflammation by suppression of NF- κ B. In addition, cytokines such as TNF- α , can stimulate the expression of MnSOD mRNA in an attempt to contain the inflammation [61]. Thus, the increased activity of the MnSOD [49,63] may be a reflection of a partially driven feedback loop by inflammatory cytokines in stroke patients. However, those individuals with allele V, has the MnSOD less effective in 30-40% in relation to the allele A, suggesting that reducing the effectiveness of MnSOD can decrease the suppressing inflammatory transcription factors [63].

BDNF can provide trophic support to cholinergic neurons, regulating his size, innervation, and neurochemical differentiation during development [64,65]. In addition, BDNF can increase the maturation of cholinergic neurons [66] and some studies have reported a positive feedback between cholinergic activity and neurotrophins, such BDNF [66,67]. In the central cholinergic system, studies of conventional AChE inhibitors have demonstrated that fluctuant inhibition of AChE can upregulate the expression of neurotrophins, like BDNF [68,69].

Some studies have shown a connection between the inflammatory and cholinergic signalling routes [27,70,71]. Cholinergic anti-inflammatory pathways inhibits the synthesis and release of cytokines via ACh specific receptor activation [72]. In this line, an interrelation between the inflammatory reactions and the ability of ACh hydrolysis was described, indicating that the increase in this capacity may have been induced by stress, and thus accentuate the stroke inflammation [73], especially, as observed in this study, in patients with the VV genotype. In this sense an increase in AChE activity can increase the lymphocytes proliferation and pro-inflammatory cytokines secretion such as TNF- α , and so contributing to the inflammatory process by decreasing the ACh concentration in the extracellular space [74]. In fact, Hanin et al., (2014) [75] have suggested the importance of cholinergic pathway in vascular disorders since carriers of AChE SNPs presented AChE elevation in postmortem human cortices and a higher risk for arterial hypertension and other diseases, such as stroke [76].

In conclusion, we found an association of MnSOD Ala16Val polymorphism with stroke, related to lower peripheral BDNF and ACh levels as well as higher nitrosative stress, inflammatory and apoptosis-related markers, especially to patients with VV genotype. Altogether, these data suggests an important role of BDNF in maintenance of redox balance after stroke, contributing to decrease in inflammatory and apoptotic response. Moreover, it corroborates previous findings showing common SNPs to be related to stroke development and, indicating the understanding of gene to environment interactions is key to prevent, treat and perhaps avoid stroke once a genetic background is known.

References

- [1] World Health Organization World Health Report 2010, 2010. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- [2] Woodruff TM, Thundyil J, Tang SC, Sobey CG, Taylor SM, Arumugam TV. (2011) Pathophysiology, treatment, and animal and cellular models of human ischemic stroke. *Mol. Neurodegener.*; 6, 11–29.
- [3] Lloyd-Jones D, Adams RJ, Brown TM, Carnethon M, Dai S, De Simone G, Ferguson TB, Ford E, Furie K, Gillespie C, Go A, Greenlund K, Haase N, Hailpern S, Ho PM, Howard V, Kissela B, Kittner S, Lackland D, Lisabeth L, Marelli A, McDermott MM, Meigs J, Mozaffarian D, Mussolino M, Nichol G, Roger VL, Rosamond W, Sacco R, Sorlie P, Stafford R, Thom T, Wasserthiel-Smoller S, Wong ND, Wylie-Rosett J. Heart disease and stroke statistics—2010 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2010;121:e46–e215. Epub December 17, 2009.
- [4] Cechetti F, Worm PV, Lovatel G, Moysés F, Siqueira IR, Netto CA. (2012) Environmental enrichment prevents behavioral deficits and oxidative stress caused by

chronic cerebral hypoperfusion in the rat. *Life Sci.* 91:29-36.

[5] Shichita TG, Sakaguchi TR, Suzuki M, Yoshimura A. (2012) Post-ischemic inflammation in the brain. *Frontier In.*, Volume 3; Article 132.

[6] Goldstein LB, Bushnell CD, Adams RJ, Appel JL, Braun LT, Chaturvedi S, Creager MA, Culebras A, Eckel RH, Hart RG, Hinchey JA, Howard VJ, Jauch EC, Levine SR, Meschia JF, Moore WS, Nixon JV, Pearson TA. (2011) Guidelines for the primary prevention of stroke: a Guideline for Healthcare Professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*, vol. 42, no. 2, pp. 517–584.

[7] Broughton BR, Reutens DC, Sobey CG (2009) Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. *Stroke*. 2009 May;40(5):e331-9. doi: 10.1161/STROKEAHA.108.531632. Epub 2009 Jan 29.

[8] Heeba GH, El-Hanafy AA (2012) Nebivolol regulates eNOS and iNOS expressions and alleviates oxidative stress in cerebral ischemia/reperfusion injury in rats. *Life Sci.* v. 90, p. 388–395.

[9] Finkel T (1998) Oxygen radicals and signaling *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 10, n. 2, p. 248–253.

[10] Thannickal VJ, Fanburg BL (2000) Reactive oxygen species in cell signaling. *The American Journal of Physiology*, v. 279, n. 6, p. L1005–L1028.

[11] Fukai T, Ushio-Fukai M (2011) Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxid Redox Signal* 15:1583-1606.

[12] Chen H, et al (2011) Oxidative stress in ischemic brain damage: mechanisms of cell death and potential molecular targets for neuroprotection. *Antioxidants and redox signaling*, v. 14, n. 8.

[13] Roy D, et al (2006) Role of reactive oxygen species on the formation of the novel diagnostic marker ischemia modified albumin. *Heart*, v. 92, p. 113-114.

[14] Collinson PO, et al (2006) Utility of admission cardiac troponin and "Ischemia Modified Albumin" measurements for rapid evaluation and rule out of suspected acute myocardial infarction in the emergency department. *Emerg. Med. J.*, v.23, p. 256-261.

[15] Palmirotta R, et al (2015). Is SOD2 Ala16Val Polymorphism Associated with Migraine with Aura Phenotype? *Antioxidants & Redox Signaling* Volume 22, Number 3. DOI: 10.1089/ars.2014.6069.

[16] Westbroek EM, Pawlikowska L, Lawton MT, McCulloch CE, Young WL, Kim H. 2012. Brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism predicts worse functional outcome after surgery in patients with unruptured brain arteriovenous malformation. *Stroke*. Aug;43(8):2255-7. doi: 10.1161/STROKEAHA.112.663096. Epub 2012 Jul 5.

[17] Chamorro A, Hallenbeck J (2006) The harms and benefits of inflammatory and immune responses in vascular disease. *Stroke*, v. 37, p. 291–293.

[18] Pandya RS, et al (2011) Central Nervous System Agents for Ischemic Stroke: Neuroprotection Mechanisms. *Cent. Nerv. Syst. Agents Med. Chem.*, v. 11, p. 81–97.

[19] Baund V, Karin M (2001) Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol.*, v. 11, n. 9, p. 372–377.

[20] Park KM, Bowers, WJ (2010) Tumor necrosis factor-alpha mediated signaling in neuronal homeostasis and dysfunction. *Cell Signal* v. 22, n. 7, p. 977–983.

[21] Gross A, et al (1999) Death and survival signals determine active/inactive conformations of pro-apoptotic BAX, BAD, and BID molecules. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, v. 64, p. 343-50.

- [22] Schneider-brachert W, et al (2004) Compartmentalization of TNF receptor 1 signaling: internalized TNF receptors as death signaling vesicles. *Immunity*, v. 21, n. 3, p. 415-28.
- [23] Graham SH, Chen J (2001) Programmed cell death in cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, v. 21, p. 99–10.
- [24] Sugawara T, et al (2004) Neuronal death/survival signaling pathways in cerebral ischemia. *NeuroRx*, v. 1, p. 17-25.
- [25] Kawashima K, Fujii T (2003) The lymphocytic cholinergic system and its contribution to the regulation of immune activity. *Life Sci.*, v. 74, p. 675–96.
- [26] Skok MV, et al (2007) The role of nicotinic receptors in B lymphocyte development and activation. *Life Sci.*, v. 80, p. 2334–6.
- [27] Ben-assayag E, et al (2010) Serum cholinesterase activities distinguish between stroke patients and controls and predict 12-month mortality. *Mol. Med.*, v. 16, p. 278-286.
- [28] Mcallister AK, Katz LC, Lo DC (1999) Neurotrophins and synaptic plasticity. *Annu. Rev. Neurosci.*, v. 22, p. 295–318. [PubMed: 10202541].
- [29] Chao MV (2006) Neurotrophin signalling in health and disease. *Clin. Sci. (Lond)*, v. 110, p. 167–173. [PubMed: 16411893].
- [30] Yang JL, et al (2013) BDNF and exercise enhance neuronal DNA repair by stimulating CREB-mediated production of apurinic/aprimidinic endonuclease 1. *NeuroMolecular Med.* In press.
- [31] Binder DK, Scharfman HE (2004) Brain-derived neurotrophic factor. *Growth Factors*, v. 22, p. 123–131.
- [32] Nagatsu T, Sawada M (2005) Inflammatory process in Parkinson's disease: role for cytokines. *Curr. Pharm. Des.*, v. 11, p. 999–1016. [PubMed: 15777250].
- [33] Crawford A, Fassett RG, Geraghty DP et al (2012) Relationships between single nucleotide polymorphisms of antioxidant enzymes and disease. *Gene* 501:89-103.
- [34] Macko RF, Ivey FM, Forrester LW, Hanley D, Sorkin JD, Katz LI, Silver KH and Goldberg AP. (2005). Treadmill Exercise Rehabilitation Improves Ambulatory Function and Cardiovascular Fitness in Patients With Chronic Stroke : A Randomized, Controlled Trial *Stroke* 2005, 36:2206-2211
- [35] Lam JM, Globas C, Cerny J, Hertler B, Uludag K, Forrester LW, Richard F. Macko, Daniel F. Hanley, Clemens Becker, Andreas R. Luft. (2010). Predictors of Response to Treadmill Exercise in Stroke Survivors. *Neurorehabil Neural Repair*. 2010; 24: 567–574.
- [36] Esposti, MD. (2002) Measuring mitochondrial reactive oxygen species. *Methods*. v. 26, p. 335-340.
- [37] Tatsch E, Bochi GV, Pereira Rda S, Kober H, Agertt VA, de Campos MM, Gomes P, Duarte MM, Moresco RN. (2011) A simple and inexpensive automated technique for measurement of serum nitrite/nitrate. *Clin Biochem.* Mar;44(4):348-50.
- [38] Zhang Y, et al (2011) Development and validation of a sample stabilization and a UPLC-MS/MS method for the simultaneous quantitation of acetylcholine (Ach), histamine (HA), and its metabolites in rat cerebrospinal fluid (CSF). *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, v. 15, n. 879, p. 2023-33. doi: 10.1016/j.jchromb.2011.05.030. Epub 2011 May 27.
- [39] Há TTN, et al (2011) Elevated Levels of Cell-Free Circulating DNA in Patients with Acute Dengue Virus Infection. *PloS One*.
- [40] Taufer M, et al (2005) Is the val16ala manganese superoxide dismutase polymorphism associated with the aging process? *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, v. 60, p. 432-438.

- [41] He T, Katusic ZS (2012) Brain-derived neurotrophic factor increases expression of MnSOD in human circulating angiogenic cells. *Microvasc. Res.*, v. 83, n. 3, p. 366-71, 2012. doi: 10.1016/j.mvr.2012.01.001. Epub Jan 9.
- [42] Markham A, et al (2014) Changes in mitochondrial function are pivotal in neurodegenerative and psychiatric disorders: How important is bdnf? *Br. J. Pharmacol.*, v. 171, p. 2206-2229.
- [43] Park KM, Bowers WJ (2010) Tumor necrosis factor-alpha mediated signaling in neuronal homeostasis and dysfunction. *Cell Signal* v. 22, n. 7, p. 977-983.
- [44] Nathan C, Xie QW (1994) Nitric oxide synthases: Roles, tolls, and controls. *Cell*. v. 78, p. 915-918.
- [45] Hemmens B, Mayer B (1998) Enzymology of nitric oxide synthases. *Methods Mol. Biol.*, v. 100, p. 1-32.
- [46] Pascotini ET, et al (2015) Apoptotic markers and DNA damage are related to late phase of stroke: Involvement of dyslipidemia and inflammation. *Physiol. Behav.* v. 151, p. 369-378.
- [47] Huang HF, et al (2012) Neuroprotection by manganese superoxide dismutase (mnsod) mimics: Antioxidant effect and oxidative stress regulation in acute experimental stroke. *CNS Neurosci. Ther.*, v. 18, p. 811-818.
- [48] Duarte MM, et al (2010) Oxidative stress in hypercholesterolemia and its association with Ala16Val superoxide dismutase gene polymorphism. *Clin Biochem.*, v. 43, p. 1118-1123.
- [49] Sugawara T, et al (2004) Neuronal death/survival signaling pathways in cerebral ischemia. *NeuroRx*, v. 1, p. 17-25.
- [50] Watts LT, et al (2013) Stroke neuroprotection: Targeting mitochondria. *Brain Sci.*, v. 3, p. 540-560.
- [51] Galluzzi L, et al (2009) Targeting post-mitochondrial effectors of apoptosis for neuroprotection. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1787, p. 402-413.
- [52] Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C (2007) Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol. Rev.*, v. 87, p. 99-163.
- [53] Conde de la rosa L, et al (2006) Superoxide anions and hydrogen peroxide induce hepatocyte death by different mechanisms: Involvement of jnk and erk map kinases. *J. Hepatol.*, v. 44, p. 918-929.
- [54] Park S, et al (2010) Superoxide is a potential culprit of caspase-3 dependent endothelial cell death induced by lysophosphatidylcholine. *J. Physiol. Pharmacol.*, v. 61, p. 375-381.
- [55] Cerne JZ, et al (2011) Estrogen metabolism genotypes, use of long-term hormone replacement therapy and risk of postmenopausal breast cancer. *Oncol. Rep.*, v. 26, p. 479-485.
- [56] Nathan C (2002) Points of control in inflammation. *Nature*, vol. 420, n. 6917, p. 846-852.
- [57] Deustch EA, et al (1990) Hemorrhagic shock-induced bacterial translocation: the role of neutrophils and hydroxyl radicals. *Journal of Trauma*, v. 30, n. 8, p. 942-95.
- [58] Droy-lefaix MT, et al (1991) Superoxide dismutase (SOD) and the PAFantagonist (BN 52021) reduce small intestinal damage induced by ischemia-reperfusion. *Free Radical Research Communications*, v. 13, p. 725-735.
- [59] Salvemini D, et al (1996) Evidence of peroxynitrite involvement in the carrageenan induced rat paw edema. *European Journal of Pharmacology*, v. 303, n. 3, p. 217-220.
- [60] Li C, Zhou HM. (2011) The role of manganese superoxide dismutase in inflammation defense. *Enzyme Res.* 2011:387176

- [61] Wong GH, Goeddel DV (1988) Induction of manganous superoxide dismutase by tumor necrosis factor: Possible protective mechanism. *Science*. v. 242, p. 941-944.
- [62] Tsan MF, Clark RN, Goyert SM, White JE (2001) Induction of TNF-alpha and MnSOD by endotoxin: role of membrane CD14 and Toll-like receptor-4. *Am J Physiol Cell Physiol*. Jun;280(6):C1422-30.
- [63] Sutton A, et al (2003) The ala16val genetic dimorphism modulates the import of human manganese superoxide dismutase into rat liver mitochondria. *Pharmacogenetics*. v. 13, p. 145-157.
- [64] Crowley C, Spencer SD, Nishimura MC, et al (1994) Mice lacking nerve growth factor display perinatal loss of sensory and sympathetic neurons yet develop basal forebrain cholinergic neurons. *Cell* 76: 1001-1011.
- [65] Yuen EC, Howe CL, Li Y, Holtzman DM, Mobley WC (1996) Nerve growth factor and the neurotrophic factor hypothesis. *Brain Dev* 18: 362-368.
- [66] Ward NL, Hagg T (2000) BDNF is needed for postnatal maturation of basal forebrain and neostriatum cholinergic neurons in vivo. *Exp Neurol* 162: 297-310.
- [67] Da Penha Berzaghi M, Cooper J, Castren E (1993) Cholinergic regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and nerve growth factor (NGF) but not neurotrophin-3 (NT-3) mRNA levels in the developing rat hippocampus. *J Neurosci* 13: 3818-3826.
- [68] Lindefors N, Ernfors P, Falkenberg T, Persson H (1992) Septal cholinergic afferents regulate expression of brain-derived neurotrophic factor and beta-nerve growth factor mRNA in rat hippocampus. *Exp Brain Res* 88: 78-90.
- [69] Betancourt AM, Filipov NM, Carr RL (2007) Alteration of neurotrophins in the hippocampus and cerebral cortex of young rats exposed to chlorpyrifos and methyl parathion. *Toxicol Sci* 100: 445-455.
- [70] Metz CN, Tracey KJ (2005) It takes nerve to dampen inflammation. *Nat. Immunol.*, v. 6, p. 756-7.
- [71] Shaked I. et al (2009) MicroRNA-132 potentiates cholinergic anti-inflammatory signaling by targeting acetylcholinesterase. *Immunity*. v. 31, p. 965-73.
- [72] Hejmadi MV, et al (2003) Neuroprotection by nicotine against hypoxia-induced apoptosis in cortical cultures involves activation of multiple nicotinic acetylcholine receptor subtypes. *Mol. Cell. Neurosci.*, v. 24, p. 779-86.
- [73] Kaufer D, et al (1998) Acute stress facilitates long-lasting changes in cholinergic gene expression. *Nature*, v. 393, p. 373-7.
- [74] Reardon C, et al (2013) Lymphocyte-derived Ach regulates local innate but not adaptive immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 110, p. 1410-5.
- [75] Hanin G. (2014). Competing targets of microRNA 608 affect anxiety and hypertension. *Human Molecular Genetics*, 2014, Vol. 23, No. 17 4569-4580 doi:10.1093/hmg/ddu170.

[76] McEwen BS, Gianaros PJ. (2011) Stress- and allostasis-induced brain plasticity. *Annu. Rev. Med.*, 62, 431–445.).

Figure Legends

Fig. 1 Genotype distribution, according to the chi-square analysis, with differences between the control group and stroke group in AA genotype, being higher frequency in the control group, and in the VV genotype, being higher frequency in stroke group (*)

Fig. 2 The levels of DCF (A) and NOx (B) are presented. Comparisons between stroke and control groups (*). Comparisons between genotypes in stroke and/or control groups (#)

Fig. 3 The levels of TNF- α (A), AChE (B) and ACh (C) are presented. Comparisons between stroke and control groups (*). Comparisons between genotypes in stroke and/or control groups (#)

Fig. 4 The activity levels of CASP 8 (A), CASP 3 (B) and the PG (C) quantification are showed. Comparisons between stroke and control groups (*). Comparisons between genotypes in stroke and/or control groups (#)

Fig. 5 Quantification levels of BDNF. Comparisons between stroke and control groups (*). Comparisons between genotypes in stroke and/or control groups (#)

Conflict of Interest

On behalf of all authors, the correspondig author states that there is no conflict os interest.

Table 1 - Baseline characteristics of study subjects.

Characteristic	Stroke Group(n=40)	Control Group (n=40)	<i>p Value</i>
Age	63 ± 2.1	56 ± 1.6	>0.05
Male (%)	67.5	55	>0.05
BMI (Kg/ m ²)	26.7 ± 0.3	22.4 ± 0.4	<0.0001
Hypertension (%)	82.5	0	<0.0001
Smokers (%)	5	0	>0.05
Sedentary (%)	47.5	0	<0.05
Glucose (mg/dl)	97.9 ± 4.2	81.5 ± 1.1	<0.001
Cholesterol (mg/dl)	189.0 ± 7.9	150.3 ± 2.2	<0.0001
HDL (mg/dl)	51.0 ± 2.1	55.2 ± 1.4	>0.05
LDL (mg/dl)	110 ± 8.3	75.4 ± 2.5	<0.001
Triglycerides (mg/dl)	143.1 ± 9.5	102.2 ± 6.1	<0.001

Data are expressed as mean ± standard error of the mean (SEM) or percentage. Significant Values = $p < 0.05$. BMI = Body Mass Index, AP = Alkaline Phosphatase.

Figure 1

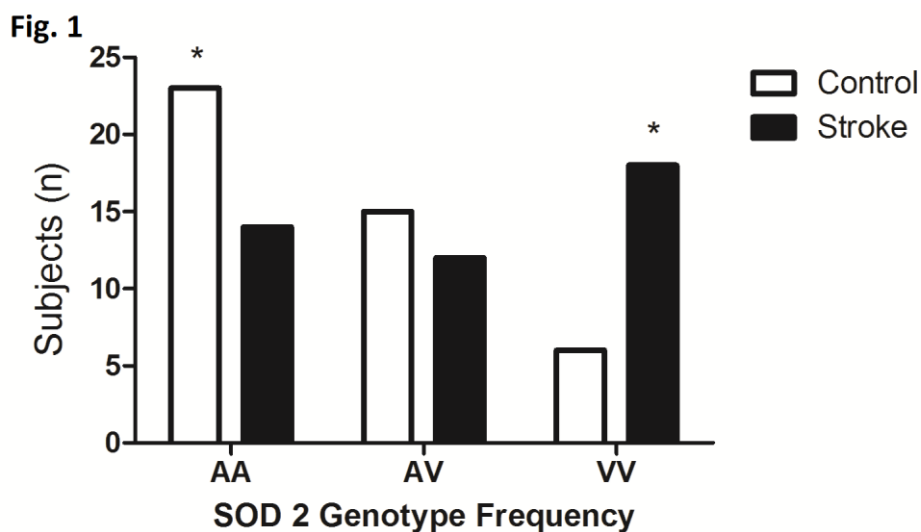


Figure 2

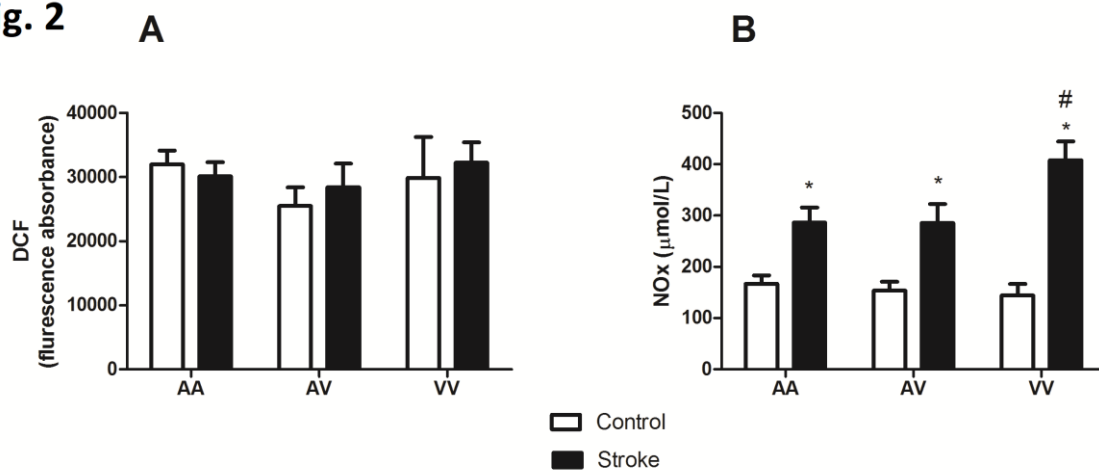
Fig. 2

Figure 3

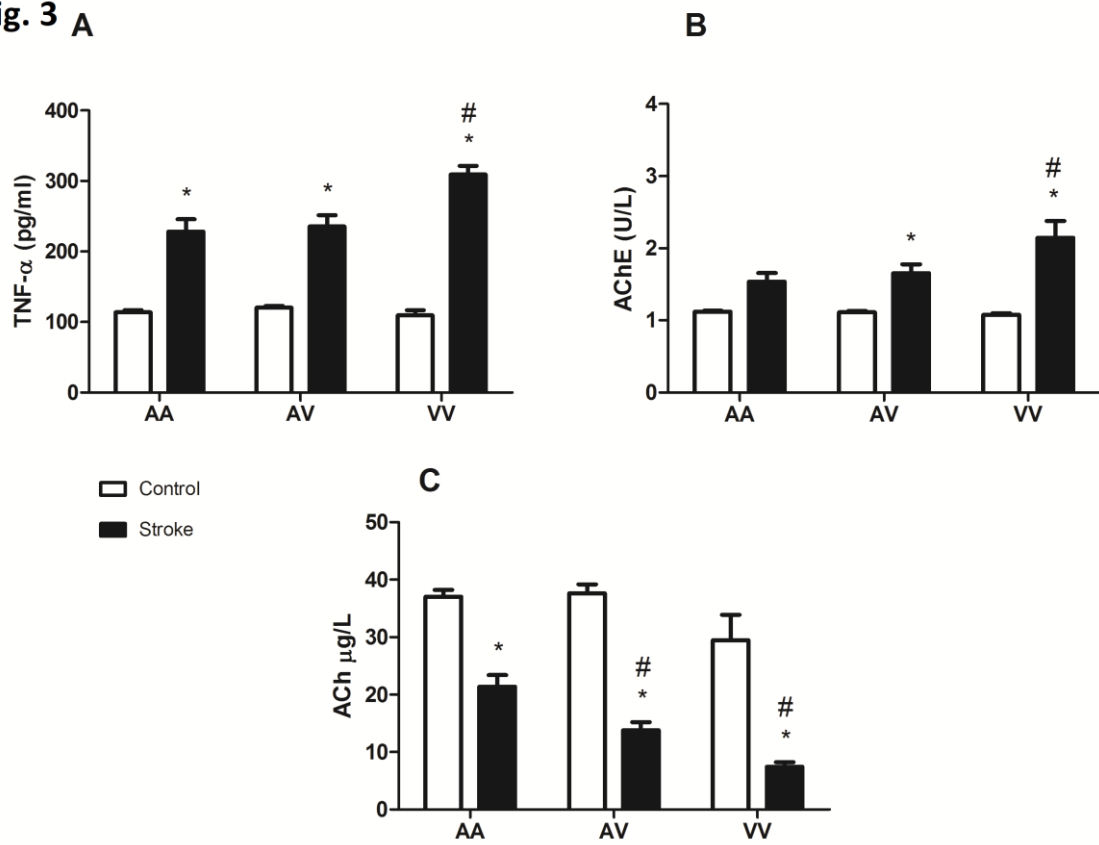
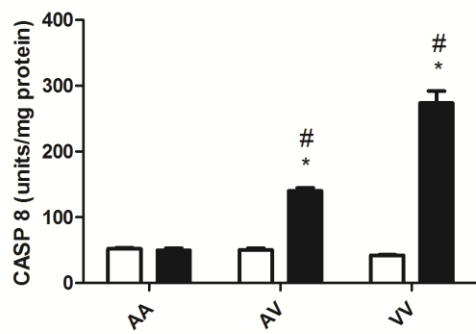
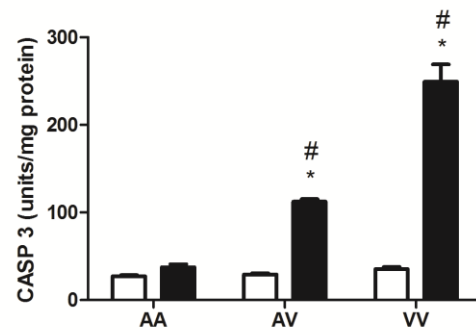
Fig. 3

Figure 4

Fig. 4 A



B



C

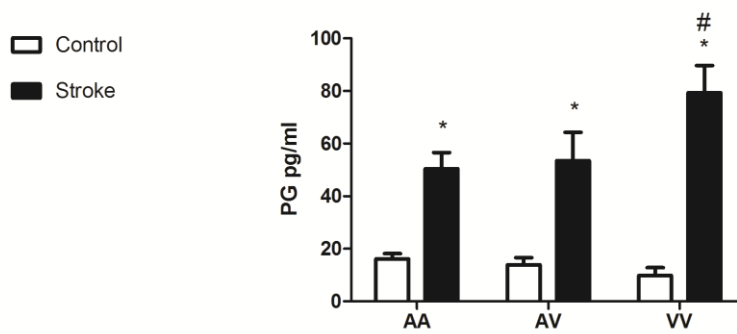
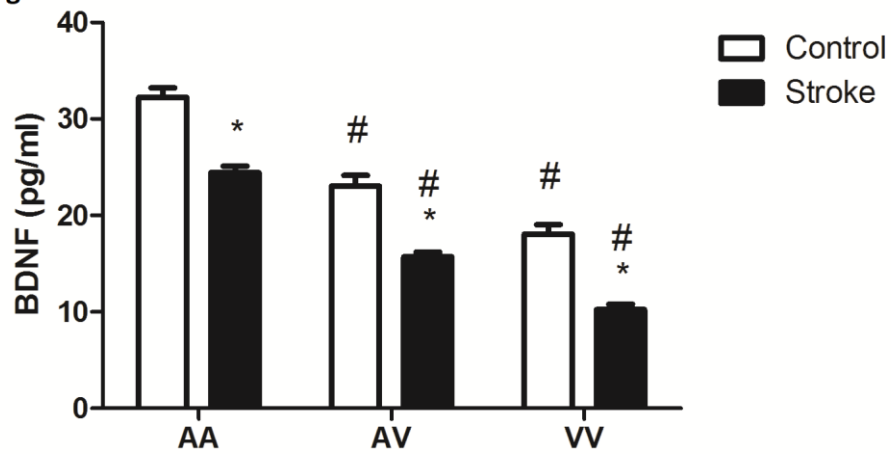


Figure 5

Fig. 5



3.2 Manuscrito 2

Physiotherapy
Elsevier Editorial System (tm) for
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: MnSOD Alal6Val polymorphism is related to motor and cognitive impairment in stroke patients: BDNF and acetylcholine involvement

Article Type: Original Research

Keywords: MnSOD Alal6Val Polymorphism, Stroke, BDNF, Motor Impairment, Cognitive Deficits.

Corresponding Author: Dr. Michele Rechia Figuera, PhD

Corresponding Author's Institution: Universidade Federal de Santa Maria

First Author: Michele Rechia Figuera, PhD

Order of Authors: Michele Rechia Figuera, PhD; Eduardo Pascotini; Ariane Flores; Aline Kegler; Viviana Konzen; Ana Letícia Fornari; Josi Arend; Patricia Gabbi; Luciana Gobbo; Guilherme Bochi; Ana Lucia Prado; Leandro Carvalho; Marta Duarte; Ivana Cruz; Rafael Moresco; Adair Santos; Mauro Oliveira; Ana Flávia Furian; Luiz Fernando Royes

Manuscript Region of Origin: BRAZIL

Cover letter

Centro de Ciências da Saúde
Departamento de Neuropsiquiatria
Universidade Federal de Santa Maria,
Av. Roraima 1000,
97105-900
Santa Maria
Brazil

Santa Maria, 11.08.2019

Editor, *Physiotherapy*

We are submitting the manuscript entitled "MnSOD Ala16Val polymorphism is related to motor and cognitive impairment in stroke patients: BDNF and acetylcholine involvement" for consideration as research article to be published in neuroscience. This manuscript is in accordance with the Authorship statement of ethical standards for manuscripts submitted to *Physiotherapy*

The MnSOD Ala16Val single nucleotide polymorphism (SNP) has shown to be associated to risk factors of several metabolic and vascular diseases. However little is known about relation of this SNP on motor and cognitive impairment in stroke, what involves various clinic and molecular changes, such as memory and motor deficits, neurotransmitters dysfunction and neurotrophic factors reduction. Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) plays a role in neurodegenerative diseases regeneration as well as has a relation with motor and cognitive function in stroke. The ACh is a neurotransmitter that plays an important role in the regulation of numerous functions, including memory, learning and movement.

Although ALA16VAL MnSOD SNP is related with various diseases and, studies of its association with the late phase of stroke and your consequences are still to be performed.

In this sense, the objective of this study was to evaluate if MnSOD Ala16Val SNP may be associated to cognitive and motor impairments, as well as if ACh and BDNF levels are related to clinical impairment in stroke patients.

MnSOD Ala16Val polymorphism is related to motor and cognitive impairment in stroke patients: BDNF and acetylcholine involvement

Eduardo Tanuri Pascotini^{a,b}, Ariane Ethur Flores^{a,d}, Aline Kegler^{a,b}, Vivana Konzen^a, Ana Letícia Fornari^a, Josi Arend^{a,d}, Patricia Gabbi^d, Luciana Assis Gobo^f, Guilherme Vargas Bochi^d, Ana Lucia Cervi Prado^c, Leandro Machado de Carvalho^f, Marta M. M. F. Duarte^d, Ivana B. M da Cruz^d, Rafael Noal Moresco^d, Adair Roberto Soares dos Santos^d, Mauro Schneider Oliveira^d, Ana Flávia Furian^d, Luiz Fernando Freire Royes^{b,c,d}, Michele Rechia Fighera^{a,b,c,d*}

^a*Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Neuropsiquiatria, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil*

^b*Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil.*

^c*Centro de Educação Física e Desportos, Laboratório de Bioquímica do Exercício (BIOEX), Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil.*

^d*Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil.*

^e*Serviço de Fisioterapia, Hospital Universitário de Santa Maria, RS, Brazil*

^f*Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil.*

*Michele Rechia Fighera, MD, PhD

Centro de Ciências da Saúde

Departamento de Neuropsiquiatria

Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brasil

FAX: 55 55 3220 8018

e-mail: mrfighera@yahoo.com.br

Acknowledgments

This work was supported by the CNPq (grants: Sports Ministry: 3090017) M.R. Fighera; L.F.F. Royes; Furian A.F.; Schneider-Oliveira, M.; Santos A.R.S.; Cruz I.M.; Moresco, R.N. are recipients of CNPq fellowships. All authors confirm that there is no competing financial conflict of interest.

Abstract

The MnSOD Ala16Val single nucleotide polymorphism (SNP) has shown to be associated to risk factors of several metabolic and vascular diseases. However little is known about relation of MnSOD Ala16Val SNP on motor and cognitive impairment in stroke, a frequent neurologic disease that involves various clinic and molecular changes, such as memory and motor deficits, neurotransmitters dysfunction and neurotrophic factors reduction. Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) is a member of the family of neurotrophins, which has an essential role in regeneration in neurodegenerative diseases as well as has a relation with motor and cognitive function in stroke. ACh is a neurotransmitter that plays an important role in the regulation of numerous vital functions, including memory, learning and movement. In this sense, the objective of this study was to evaluate if MnSOD Ala16Val SNP may be associated to cognitive and motor impairments, as well as if ACh and BDNF levels are related to clinical impairment in stroke patients. Forty-eight stroke patients and 50 healthy controls were submitted to questionnaires, laboratorial exams and clinical tests. Neupsilin and motor (Senior Fitness Test and Balance Berg Scale) tests, BDNF and ACh levels were performed. Statistical analysis showed a worse performance in working and total memory, as well as in motor tests in VV post-stroke. Additionally, a lower BDNF and ACh levels in VV and AV post-stroke were observed. Thus, it is plausible propose that stroke patients with VV genotype present a poor outcome in relation to cognitive and motor function. Our findings related these clinical impairments to BDNF and Ach levels, suggesting that the knowlegment of polymorphism existence is crucial to evaluate molecular mechanisms associated to neurovascular injury and improves the treatment of these patients.

Key-Words: MsSOD Ala16Val Polymorphism, Stroke, BDNF, Motor Impairment, Cognitive Deficits.

INTRODUCTION

Stroke is a neurological disorder with a high rate of morbidity and mortality [1]. Ischemic stroke accounts for 85% of all cases [2] and leads to functional impairments, with 15% to 30% of the patients presenting permanently disabled [3]. Between the main motor injuries related to stroke there are decreased muscle strength, motor incoordination and spastic hypertonia [4], resulting in functionality decreased through gait disorders, loss of balance, disability or activities of daily life limitations [5-7].

In addition, studies have also showed damaging effects to cognitive processes post-stroke, such as functioning executive ability, information processing speed and memory [8,9].

In stroke, there is a complex cascade of molecular and cell mechanisms involved in ischemic cell death and are characterized by bioenergetic failure, excitotoxicity, oxidative stress and inflammation [10,11]. Oxidative stress is characterized as an imbalance between antioxidant defenses and oxidizing agents [12] and has an important role in stroke pathophysiology [13,14]. Among antioxidant enzymes, the superoxide dismutase (SOD) has role of degrade O_2^- in H_2O_2 , which will later be converted into water (H_2O) by the other antioxidant enzymes [15-17]. There are three classes of SOD, depending on your location and metal component: SOD1, SOD2 and SOD3 [18].

Manganese-dependent superoxide dismutase (Mn-SOD or SOD2), one of three isoforms of this antioxidant enzyme [19], contains a gene with 5 exons and is located on chromosome 6q25 [20]. One of the most common polymorphisms of Mn-SOD is due to replacement of alanine 16 (GCT) and valine (GTT), resulting in the polymorphism Ala16Val. This mutation can reflect in a functional enzyme reduction the mitochondrial level, which would imply a decreased efficiency of the enzyme. The Ala-MnSOD has demonstrated a greater effectiveness in the control of generation of O_2^- about mitochondrial mutation Val-MnSOD [21].

BDNF is a member of the family of neurotrophins, being the most neurotrophic factor distributed in the brain, which has an essential role in neuronal plasticity and regeneration in neurodegenerative diseases [22]. This neurotrophin can pass the blood-brain barrier in situations such as stroke, and exert a protective effect at the site of injury during acute phase post-ischaemic [23] and can reduce the risks of the stroke by its

neurotrophic and vascular effects [24,25]. Recent data indicate that there is a close relationship between MnSOD and BDNF [26,27].

The expression of BDNF also has a relationship with motor and cognitive function decline post-stroke and with your recovery at later stages [9]. Some studies have shown that lower levels of BDNF correlate positively with memory deficits in neurological diseases [28, 29], including stroke [30].

ACh is a neurotransmitter that has an important role in the regulation of numerous vital functions, including memory, learning and movement, especially in hippocampus [31]. Another ACh function is related with the muscle function, once in the somatic nervous system the muscular contraction occurs through this neurotransmitter release by axonal branches [32]. In this context, some studies had showed relation between memory and motor function with cholinergic levels (ACh) and neurotrophic factors, such as BDNF [33, 34, 32].

Then, we decide to evaluate if MnSOD Ala16Val SNP may be associated to cognitive and motor impairments in stroke patients, and if these parameters may be related with ACh and BDNF levels.

MATERIAL AND METHODS

Study population

We performed a case-control study with 103 participants that were divided into two groups: control group (50 healthy participants) and the stroke group (53 post-stroke participants). At first, participants were evaluated using a questionnaire. From the initial 53 stroke patients, 48 were selected according the following exclusion criteria: 1) systolic/diastolic blood pressure at rest $\geq 180/100$ mmHg, 2) rest heart rate ≥ 100 bpm and/or 3) alterations in two or more of the following parameters in the last three months: transaminases (TGO, TGP), gamma-glutamyl transferase GGT, alkaline phosphatase, prothrombin time (TP), RNI, KTTTP, albumin, bilirubin, creatinine, sodium, potassium, ionic calcium, urea, VSG, protein C reactive and hemogram (including leukocyte count).

To analyze risk factors for stroke, internal medicine specialists diagnosed hypertension, diabetes mellitus, and dyslipidemia. Hypertension was diagnosed if subjects were taking antihypertensive agents or had a systolic blood pressure of ≥ 140 mm Hg or diastolic blood pressure of ≥ 90 mm Hg. Diabetes mellitus was diagnosed if subjects were taking oral anti-hyperglycemic agents or insulin or if their fasting blood

glucose level was ≥ 100 mg/dl. Dyslipidemia was diagnosed if subjects were taking dyslipidemia medication or had a serum low-density lipoprotein cholesterol level of < 40 mg/dl, a triglyceride level of ≥ 150 mg/dl, or a high-density lipoprotein cholesterol level of ≥ 160 mg/dl. Smoking status was recorded as non-smoker or current smoker (if they had quit at least 6 months before). The study protocol was approved by the local institutional review boards at the authors' affiliated institution. Informed consent was obtained from all the subjects or their legal surrogates (number 10555912.3.0000.5346). The work described has been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki).

Biochemical analyses

Blood samples were collected after 12 h overnight fasting by venous puncture into gray, purple, green and red top Vacutainers[®] tubes (BD Diagnostics, Plymouth, UK) with sodium fluoride, EDTA, heparin or no anticoagulants, respectively. Serum was used to measure AChE, total, HDL and LDL cholesterol, urea, creatinine, TGO, TGP, and alkaline phosphatase. Plasma with EDTA was used to ACh. These concentrations were measured using standard enzymatic methods by the use of Ortho-Clinical Diagnostics[®] reagents on a fully automated analyzer (Vitros 950[®] dry chemistry system; Johnson & Johnson, Rochester, NY, USA). Plasma EDTA was used to quantify glycated hemoglobin A1C (HbA1C) through the Bio-Rad Variant II system, with HPLC by ionic change.

MnSOD Ala16Val genotyping

Genomic DNA was isolated from peripheral blood leukocytes using a DNA Mini Kit Purification (Mo Bio). MnSOD Ala16Val SNP was detected by PCR-RFLP [36]. PCR amplifications were performed in a total volume of 50 μ l containing 5 μ l of 10 \times buffer, 1 μ l of 25 mM MgCl₂, 1.25 μ l of 10mM dNTP, 0.5 μ l of Taq Polymerase (Gibco Inc, Co.), 1 μ l of each primer (40 pmol), 3 μ l of genomic DNA (0.25 μ g), and 34.5 μ l of ddH₂O. The amplification primers (Gibco Inc, Co.) for a 110-bp fragment of the human MnSOD gene were 5'-ACCAGCAGGCAGCTGGCGCCGG-3' (sense strand) and 5'-GCGTTGATGTGAGGTTCCAG-3' (antisense strand) with the following thermocycler parameters: an initial cycle of 95 °C for 5 min followed by 35 cycles at 95 °C for 1 min and 61 °C for 1 min. The final cycle was followed by an extension period of 2 min at 72 °C. The PCR product (10 μ l) was digested with Hae III (15 U; 37 °C, 6 h,

Gibco. Inc, Co.). Digested products (23 and 85 bp) were visualized on a 4% agarose gel (Amersham Biosciences Inc, Co.) stained with ethidium bromide. A mutation was introduced by a primer mismatch to create a restriction cut site for Hae III in the -9 codon, and the following genotypes were observed: -9Ala/Ala (23 and 85 bp); -9Ala/Val (23, 85 and 110 bp); and -9Val/Val (110 bp).

ACh determination

The determination of acetylcholine was assessed by LC-MS, the Agilent Technologies 1260 Infinity chromatography with automatic injection and mass detector Agilent Technologies Triple quadrupole 6430 [35]. The chromatographic column used for determination was a column Poroshell Column 3.0 x 100 mm 2.7 μ m particle size. Solvents used were acetonitrile degree LC-MS, Chromasolv and LC-MS degree acetic acid, Sigma-Aldrich.

Elution Isocratic condition has been established consisting of in 75% of the eluent (0.1%) acetic acid and 25% of Eluent B (acetonitrile). The race time was 3 minutes. The injection volume was 5 μ L and chromatographic flow of 0.6 mL/min. The chromatographic column was maintained at 23° C during the race.

ESI source conditions were tested and optimized in the following values: temperature of 350° C, gas flow: 10 L/min, nebulizer pressure of 15 psi and capillary voltage of 4000 v. Mass transitions used to determine the parent and product ion have been tested and selected transitions were: 146.1 to 87.1 quantifier ion m/z and 146.1 to 60.2 qualifier ion m/z. Applying these parameters optimized the chromatogram below was obtained for the determination of acetylcholine.

BDNF quantification

The BDNF serum quantification was be measured by ELISA from commercial kit for BDNF measurement in humans (eBIOSCIENCE, San Diego, USA), according to the factory instructions and homocysteine levels measured by the Immulite Analyzer (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, California).

Memory Evaluations

The memory evaluations were be performed in both study groups through a battery of cognitive tests (Neupsilin) that measured five types of memory: working memory, verbal episodic memory semantics, semantic memory, visual memory,

memory foresight and total memory [36]. The tests were carried out by specific training for such psychological.

Functional Capacity Evaluation

The functional capacity of individuals results to certain physical and motor skills that will enable them to perform the activities of daily life (ADL) with certain level of functionality, among them are the strength and muscle tone of superior limbs (SL) and Inferior Limbs (IL), the static and dynamic balance and walking (gait) [37]. So for the present research are used the following functional tests: the STF Test [38] and the Berg Balance Scale [39].

Statistical Analysis

Data were expressed as the mean±error of the mean (SEM). At first, allele frequencies were estimated using the gene-counting method. Chi square analysis was used to estimate the Hardy–Weinberg equilibrium. Then, data were analyzed by unpaired *t* test, or two-way ANOVA when appropriated. A second analysis compared stroke and control participants with different Ala16Val MnSOD genotypes (AA, VV and AV) using the analysis of variance followed by the Tukey *post hoc* test. A multivariate analysis using logistic regression (Backward ald odel) was also performed to observe the potential influence of sex and age. Correlation analyses were carried out using the Pearson's correlation coefficient. Statistical analyses were performed using the SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, version 22, Chicago, USA) software in a PC-compatible computer. Significance was set at $P \leq 0.05$.

Results

Table 1 lists the baseline characteristics of the study subjects. We did not observe differences in average age, gender distributions, and percentage of smokers. In relation to the average BMI ($p < 0.0001$) and the percentage of hypertensive ($p < 0.0001$), sedentary ($p < 0.05$), glucose ($p < 0.001$), cholesterol ($p < 0.0001$), LDL ($p < 0.001$) and triglycerides ($p < 0.001$), it was possible to observe significant differences between the control group and the stroke group.

In Table 2, we showed results of neuropsychological tests according to genotype. Statistical analysis revealed higher values in working [$F(2.84) = 8.87$;

$p < 0.01$] and total memory [$F(2,84) = 11.49$; $p < 0.0001$] in control group as compared to stroke group. *Post-hoc* analysis demonstrated that VV genotype had lower results in relation to working memory ($q = 5.532$; $p < 0.001$) as compared to AA stroke group and VV genotype presented lower total memory levels in relation to AV ($q = 4.385$; $p < 0.05$) and AA ($q = 4.293$; $p < 0.05$) stroke groups.

According to the chi-square analysis, we observe a difference on the genotype distribution between the control group and stroke group. We found higher frequency of AA genotype in the control group and VV genotype in stroke group ($\chi^2 = 8.523$; $p < 0.05$), data not shown.

Figure 1 represents the upper (A) and lower (B) limb strength as part of STF test. The statistical analysis showed that stroke group has lower values of upper [$F(2,92) = 14.5$; $p < 0.0001$] and lower [$F(2,92) = 6.397$; $p < 0.0001$] limbs strength when compared to control group. The *post-hoc* analysis showed that VV stroke group presents lower values of upper ($q = 8.55$; $p < 0.0001$ and $q = 5.47$; $p < 0.002$) and lower ($q = 9.43$ and $q = 8.31$; $p < 0.001$) limbs strength as compared to AA and AV stroke groups, respectively.

The results related to Balance Berg Scale (A), TUG (B) and Gait Test (C) are presented in Figure 2. In figure 2A, statistical analysis showed that stroke group presented a lower score in Berg balance Scale as compared to control group [$F(2,92) = 30.28$; $p < 0.001$]. *Post-hoc* analysis showed that VV stroke group had lower score in relation to AV ($q = 13.8$; $p < 0.01$) and AA ($q = 19.07$; $p < 0.001$) stroke groups. In figure 2B, we observed that stroke group spend more time to realize the TUG test than control group [$F(1,92) = 86.6$; $p < 0.0001$]. *Post-hoc* analysis showed that AA, AV and VV stroke group had lower score in relation to control group. In figure 2C, our results revealed that control group walked more distance as compared to stroke group [$F(2,92) = 5.525$; $p < 0.005$] in gait test, completing the STF tests. In *post-hoc* analysis, we observed that AA ($q = 9.04$; $p < 0.0001$) and AV ($q = 7.93$; $p < 0.0001$) walked more distance as compared to VV stroke group.

In table 3, we show results about levels of BDNF and Ach levels. Statistical analysis showed lower levels of BDNF [$F(2,92) = 138.1$, $p < 0.0001$] and Ach [$F(2,92) = 16.73$; $p < 0.0001$] in the stroke group as compared to control group. The *post-hoc* analysis showed lower BDNF levels in VV stroke group as compared to AV ($q = 6.54$, $p < 0.0002$) and AA ($q = 18.25$, $p < 0.0001$) stroke groups. In relation to ACh, *post-hoc*

analysis showed that VV stroke group presented lower values as compared to AV ($t = 6.88$; $p < 0.0001$) and AA ($q = 14.81$; $p < 0.0001$) stroke groups.

Discussion

In this study, we showed the association of the MnSOD Ala16Val with cognitive and motor capacity impairment in stroke. Additionally, patients with VV genotype also showed lower ACh and BDNF levels in comparison with AA and AV patients. These findings are consistent with the results of previous studies that suggest that the MnSOD Ala16Val polymorphism is a poor prognostic factor for clinic and laboratorial parameters in stroke [40-42, 27].

In agreement, Kim et al, (2013) [43], have showed that BDNF SNP Val66Met, a SNP which reduces BDNF activity depending on genotype, presented a relation with poor outcome on memory and motor function in humans post-stroke. Additionally, studies have showed that BDNF expression is correlated with poststroke motor and cognitive function recovery, as well as decreased BDNF expression aggravated motor and cognitive impairment in stroke [30, 44, 45]. Scalzo et al. [33] have also showed that lower BDNF levels were correlated with poor balance, as assessed by the Berg Balance Scale, more time spent at the Timed Up & Go Test, reduced speed of gait, and shorter distance walked during the Six-Minute Walk Test in humans with neurodegenerative disorders. Taken together, these results corroborate with our study, which stroke patients with lower BDNF levels and VV genotype of MnSOD polymorphism presented poor results in functional and cognitive tests.

In this sense, recent studies have indicated that there is a close relationship between expression of MnSOD enzyme and BDNF [26, 27]. The treatment with BDNF increased MnSOD expression and reduced cellular apoptosis in human angiogenic cells. The same authors found that the NF κ B inhibition reduced BDNF regulation in the MnSOD expression, indicating that the signaling through BDNF may contribute, at least in part, to the increase in MnSOD expression [26, 45], corroborating with our findings.

Besides the findings aforementioned, other studies have also showed the relationship between cholinergic system and BDNF in motor and memory functions, since BDNF may promote the survival rate and growth of motor and cholinergic granules, as well as basal of forebrain cholinergic neurons [46,47].

According, BDNF can provide trophic support to cholinergic neurons, regulating its size, innervation, and neurochemical differentiation during development [47,48]. The BDNF can increase the maturation of cholinergic neurons [49] and some studies have reported a positive feedback between cholinergic activity and neurotrophins, such BDNF [49,50]. In the central cholinergic system, studies of conventional AChE inhibitors have demonstrated that fluctuant inhibition of AChE can upregulate the expression BDNF [51-53]. In this line of view, another study suggested the correlation between BDNF and Ach in motor function since this neurotrophin facilitates synaptic transmission in mature and newly-formed mouse motor neuromuscular junctions via enhancement of vesicular ACh transport [54].

Additionally, others studies have showed that polymorphism in cholinergic genes are related to cognitive decline in patients with Alzheimer's disease [55, 56]. Hanin et al., (2014) [57] have suggested the importance of colinergic pathway in vascular disorders since carriers of AChE SNPs presented AChE elevation in postmortem human crtices and a higher risk for arterial hypertension.

In conclusion, we found an association of MnSOD Ala16Val polymorphism with poor memory and motor function. Our findings related these clinical impairments to lower BDNF and ACh levels in patients with VV genotype. Thus, information about MnSOD genotype could provide insight into the type and magnitude of clinical manifestations may have across individuals and potentially help guide an individualized prescription of treatment to enhance motor and cognitive rehabilitation poststroke.

Figure Legends

Figure 1: The values of upper (A) and lower (B) limbs strength of the STF test are presented. Data are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). *P<0.05 was considered significant as compared AA, AV and VV stroke group with AA, AV and VV control groups. #P<0.05 was considered significant as compared VV stroke group with AV and AA stroke groups.

Figure 2: Values of (A) Berg balance scale, (B) Timed Up and GO (TUG) and (C) Gait test. (A) Data are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). *P<0.05 was considered significant as compared AA, AV and VV stroke groups with VV, AV and AA control groups and #P<0.05 as compared VV stroke with AA and AV stroke groups.

References

- [1] World Health Organization World Health Report 2010, 2010. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- [2] Woodruff TM, Thundyil J, Tang SC, Sobey CG, Taylor SM, Arumugam TV. (2011) Pathophysiology, treatment, and animal and cellular models of human ischemic stroke. *Mol. Neurodegener.*; 6, 11–29.
- [3] Lloyd-Jones D, Adams RJ, Brown TM, Carnethon M, Dai S, De Simone G, Ferguson TB, Ford E, Furie K, Gillespie C, Go A, Greenlund K, Haase N, Hailpern S, Ho PM, Howard V, Kissela B, Kittner S, Lackland D, Lisabeth L, Marelli A, McDermott MM, Meigs J, Mozaffarian D, Mussolino M, Nichol G, Roger VL, Rosamond W, Sacco R, Sorlie P, Stafford R, Thom T, Wasserthiel-Smoller S, Wong ND, Wylie-Rosett J. Heart disease and stroke statistics—2010 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2010;121:e46–e215. Epub December 17, 2009.
- [4] Francisco, GE et al. (2006) Consensus panel guidelines for the use of intrathecal baclofen therapy in poststroke spastic hypertonia. *Top Stroke Rehabil.*, v. 13 p. 74-85. Review.
- [5] Bruck, I et al. (2000) Cerebellar vermishypoplasia – non progressive congenital ataxia. *Arq. Neuro-Psiquiatr.*, v. 58, n. 3-B, p. 897-900.
- [6] Martins, FLM, Guimarães, LHCT, Vitorina, DFM, Souza, LCF (2004) Eficácia da eletroestimulação funcional na amplitude de movimento de dorsiflexão de hemiparéticos. *Revista Neurociências*. v. 12, n. 2, p. 130-9.
- [7] Nunes, LCBG, Quevedo, AFF (2004) Efeitos da eletroestimulação neuromuscular no músculo tibial anterior de pacientes hemi-paréticos espásticos. [Dissertação]. Campinas: Unicamp; 2004.
- [8] Dassonville P, Nash S, Servajean V et al (2016). Cognitive impairments and impact on activities of daily living after minor stroke. *Stroke / Annals of Physical and Rehabilitation Medicine* 59S (2016) e67–e79.
- [9] Himi N et al (2016) Exercise in the Early Stage after Stroke Enhances Hippocampal Brain-Derived Neurotrophic Factor Expression and Memory Function Recovery. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* Dec; 25(12):2987-2994. doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2016.08.017. Epub 2016 Sep 14.
- [10] Cechetti F, Worm PV, Lovatel G, Moysés F, Siqueira IR, Netto CA. (2012) Environmental enrichment prevents behavioral deficits and oxidative stress caused by chronic cerebral hypoperfusion in the rat. *Life Sci*. 91:29-36.
- [11] Shichita TG, Sakaguchi TR, Suzuki M, Yoshimura A. (2012) Post-ischemic inflammation in the brain. *Frontier In.*, Volume 3; Article 132.
- [12] Sies H (1997) Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*, v. 82, n. 2, p. 291–295.
- [13] Cherubini A et al. (2005) Potential markers of oxidative stress in stroke. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 39, n. 7, p. 841–852.
- [14] Samsom Y, Lapergue B, Hosseini H (2005) Inflammation and ischaemic stroke: current status and future perspectives. *Revue Neurologique*, v. 161, n.12, p.1177–1182.
- [15] Chan PH (2001) Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, v. 21, p. 2–14.
- [16] Nelson S et al.(2006) The induction of human superoxide dismutase and catalase in vivo: a fundamentally new approach to antioxidant therapy. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 40, p. 341-347.

- [17] Halliwell B, Whiteman M (2007) Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br. J. Pharmacol.*, v. 142, p. 231-55.
- [18] Zelko IN, Mariani JT, Folz JR (2002) Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution and expression. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 33, p.337-349.
- [19] Chen H et al. (2011) Oxidative stress in ischemic brain damage: mechanisms of cell death and potential molecular targets for neuroprotection. *Antioxidants and redox signaling*, v. 14, n. 8.
- [20] Roy D et al. (2006) Role of reactive oxygen species on the formation of the novel diagnostic marker ischemia modified albumin. *Heart*, v. 92, p. 113-114.
- [21] Collinson PO et al. (2006) Utility of admission cardiac troponin and "Ischemia Modified Albumin" measurements for rapid evaluation and rule out of suspected acute myocardial infarction in the emergency department. *Emerg. Med. J.*, v.23, p. 256-261.
- [22] Mcallister AK, Katz LC, Lo DC (1999) Neurotrophins and synaptic plasticity. *Annu. Rev. Neurosci.*, v. 22, p. 295–318.
- [23] Lazarro DIV et al. (2007) BDNF plasma levels in acute stroke. *Neuroscience Letters*, v. 422, p. 128–130.
- [24] Navratna D et al. (2011) Decreased cerebrovascular brain-derived neurotrophic factor-mediated neuroprotection in the diabetic brain. *Diabetes*, v. 60, n. 6, p. 1789-96.
- [25] Pikula A, Beiser AS, Chen TC et al. (2013) Serum brain-derived neurotrophic factor and vascular endothelial growth factor levels are associated with risk of stroke and vascular brain injury: Framingham Study. *Stroke*, v. 44, n. 10, p. 2768-75.
- [26] He T, Katusic ZS (2012) Brain-derived neurotrophic factor increases expression of MnSOD in human circulating angiogenic cells. *Microvasc. Res.*, v. 83, n. 3, p. 366-71, 2012. doi: 10.1016/j.mvr.2012.01.001. Epub Jan 9.
- [27] Pascotini ET, Flores AE, Kegler A et al. (2018) Brain-Derived Neurotrophic Factor levels are lower in Chronic Stroke patients: a relation with MnSOD ALA16VAL SNP through TNF- α and caspases pathways. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, Vol.27,No.11(November), pp3020-3029
- [28] Li G, Peskind ER, Millard SP, *et al*: Cerebrospinal fluid concentration of brain-derived neurotrophic factor and cognitive function in non-demented subjects. *PLoS One* 4: e5424, 2009.
- [29] Erickson KI, Prakash RS, Voss MW, *et al*: Brain-derived neurotrophic factor is associated with age-related decline in hippocampal volume. *J Neurosci* 30: 5368-5375, 2010.
- [30] Zhang ZH et al. (2012) Correlations between cognitive impairment and brain-derived neurotrophic factor expression in the hippocampus of post-stroke depression rats. *Mol. Med. Rep.*, v. 6, p. 889-893.
- [31] Coyle JT, Price DL, DeLong MR (1983) Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation. *Science*, v. 219, p. 1184-1190.
- [32] Dief EA, Samy DM, Dowedar FI (2015) Impact of exercise and vitamin B1 intake on hippocampal brain-derived neurotrophic factor and spatial memory performance in a rat model of stress. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*, v. 61, n. 1, p. 1-7. doi: 10.3177/jnsv.61.1.
- [33] Scalzo P et al. (2010) Serum levels of brain-derived neurotrophic factor correlate with motor impairment in Parkinson's disease. *J. Neurol.*, v. 257, p. 540–545. DOI 10.1007/s00415-009-5357-2

- [34] Zhao-hui Z et al. (2012) Correlations between cognitive impairment and brain-derived neurotrophic factor expression in the hippocampus of post-stroke depression rats. *Molecular Medicine Reports*, v. 6, p. 889-893.
- [35] Zhang Y, et al (2011) Development and validation of a sample stabilization and a UPLC-MS/MS method for the simultaneous quantitation of acetylcholine (Ach), histamine (HA), and its metabolites in rat cerebrospinal fluid (CSF). *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, v. 15, n. 879, p. 2023-33. doi: 10.1016/j.jchromb.2011.05.030. Epub 2011 May 27.
- [36] Fonseca, R.P., Salles, J.F., Parente, M.A.M.P. (2000) Instrumento de Avaliação Neuropsicológica Breve NEUPSILIN.
- [37] Shumway-Cook A, Woollacott MB (2000) Envelhecimento e controle postural In: *Controle motor: teorias e aplicações práticas*. 2. ed. São Paulo: Manole, p. 228-230.
- [38] Rikli RE, Jones CJ (2001) *Senior fitness manual*. Champaign: Human Kinetics.
- [39] Miyamoto ST, Lombardi I, Berg KO et al (2004). Brazilian version of the Berg balance scale. *Braz J Med Biol Res. Sep;37(9):1411-21*. Epub 2004 Aug 24.
- [40] Kakko S, Päivänsalo M, Koistinen P, Kesäniemi YA, Kinnula VL, Savolainen MJ (2003) The signal sequence polymorphism of the MnSOD gene is associated with the degree of carotid atherosclerosis. *Atherosclerosis. May;168(1):147-52*.
- [41] Kangas-Kontio T, Vavuli S, Kakko SJ, Penna J, Savolainen ER, Savolainen MJ, Liinamaa MJ (2009) Polymorphism of the manganese superoxide dismutase gene but not of vascular endothelial growth factor gene is a risk factor for diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol. Oct;93(10):1401-6*. doi: 10.1136/bjo.2009.159012. Epub 2009 Jul 23.
- [42] Flores AE, Pascotini ET, Kegler A et al (2017) Association of the ala16val mnsod gene polymorphism with a increased risk of developing stroke. *Gene. Sep 5;627:57-62*. doi: 10.1016/j.gene.2017.05.055. Epub 2017 May 25.
- [43] Kim WS, Lim JY, Shin JH, Park HK, Tan SA, Park KU, Paik NJ. Effect of the presence of brain-derived neurotrophic factor val(66)met polymorphism on the recovery in patients with acute subcortical stroke. *Ann Rehabil Med. 2013 Jun;37(3):311-9*. doi: 10.5535/arm.2013.37.3.311.
- [44] Cook, D.J.; Nguyen, C.; Chun, H.N.; Llorente, L.I.; Chiu, A.S.; Machnicki, M.; Zarembinski, T.I.; Carmichael, S.T. (2012) Hydrogel-delivered brain-derived neurotrophic factor promotes tissue repair and recovery after stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 37, 1030–1045.
- [45] Ravina K, Briggs DI, Kislal S, Warraich Z, Nguyen T, Lam RK, Zarembinski TI, Shamloo M (2018) Intracerebral Delivery of Brain-Derived Neurotrophic Factor Using HyStem[®]-C Hydrogel Implants Improves Functional Recovery and Reduces Neuroinflammation in a Rat Model of Ischemic Stroke. *Int J Mol Sci. Nov 28;19(12)*. pii: E3782. doi: 10.3390/ijms19123782.
- [46] Murer M, Yan Q and Raisman-Vozari R: Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 63: 71-124, 2001.
- [47] McAllister AK: Neurotrophins and neuronal differentiation in the central nervous system. *Cell Mol Life Sci* 58: 1054-1060, 2001.
- [48] Crowley C, Spencer SD, Nishimura MC, et al (1994) Mice lacking nerve growth factor display perinatal loss of sensory and sympathetic neurons yet develop basal forebrain cholinergic neurons. *Cell* 76: 1001-1011.
- [49] Yuen EC, Howe CL, Li Y, Holtzman DM, Mobley WC (1996) Nerve growth factor and the neurotrophic factor hypothesis. *Brain Dev* 18: 362-368.
- [50] Ward NL, Hagg T (2000) BDNF is needed for postnatal maturation of basal forebrain and neostriatum cholinergic neurons in vivo. *Exp Neurol* 162: 297-310.

- [51] Da Penha Berzaghi M, Cooper J, Castren E (1993) Cholinergic regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and nerve growth factor (NGF) but not neurotrophin-3 (NT-3) mRNA levels in the developing rat hippocampus. *J Neurosci* 13: 3818-3826.
- [52] Lindefors N, Ernfors P, Falkenberg T, Persson H (1992) Septal cholinergic afferents regulate expression of brain-derived neurotrophic factor and beta-nerve growth factor mRNA in rat hippocampus. *Exp Brain Res* 88: 78-90.
- [53] Betancourt AM, Filipov NM, Carr RL (2007) Alteration of neurotrophins in the hippocampus and cerebral cortex of young rats exposed to chlorpyrifos and methyl parathion. *Toxicol Sci* 100: 445-455.
- [54] Gaydukov A, Bogacheva P, Tarasova E et al. (2019). Regulation of Acetylcholine Quantal Release by Coupled Thrombin/BDNF Signaling in Mouse Motor Synapses. *Cells*. 2019 Jul 22;8(7). pii: E762. doi: 10.3390/cells8070762.
- [55] Chee LY, Cumming A (2018) Polymorphisms in the Cholinergic Receptors Muscarinic (*CHRM2* and *CHRM3*) Genes and Alzheimer's Disease. *Avicenna J Med Biotechnol*. Jul-Sep;10(3):196-199.
- [56] Hálová A, Janoutová J, Ewerlingová L, Janout V, Bonczek O, Zeman T, Gerguri T, Balcar VJ, Šerý O (2018) CHAT gene polymorphism rs3810950 is associated with the risk of Alzheimer's disease in the Czech population. *J Biomed Sci*. May 14;25(1):41. doi: 10.1186/s12929-018-0444-2.
- [57] Hanin G, Shenhar-Tsarfaty S, Yayon N et al (2014) Competing targets of microRNA-608 affect anxiety and hypertension. *Hum Mol Genet*. Sep 1;23(17):4569-80. doi: 10.1093/hmg/ddu170. Epub 2014 Apr 9.

Conflict of Interest

On behalf of all authors, the corresponding author states that there is no conflict of interest.

Figure 1

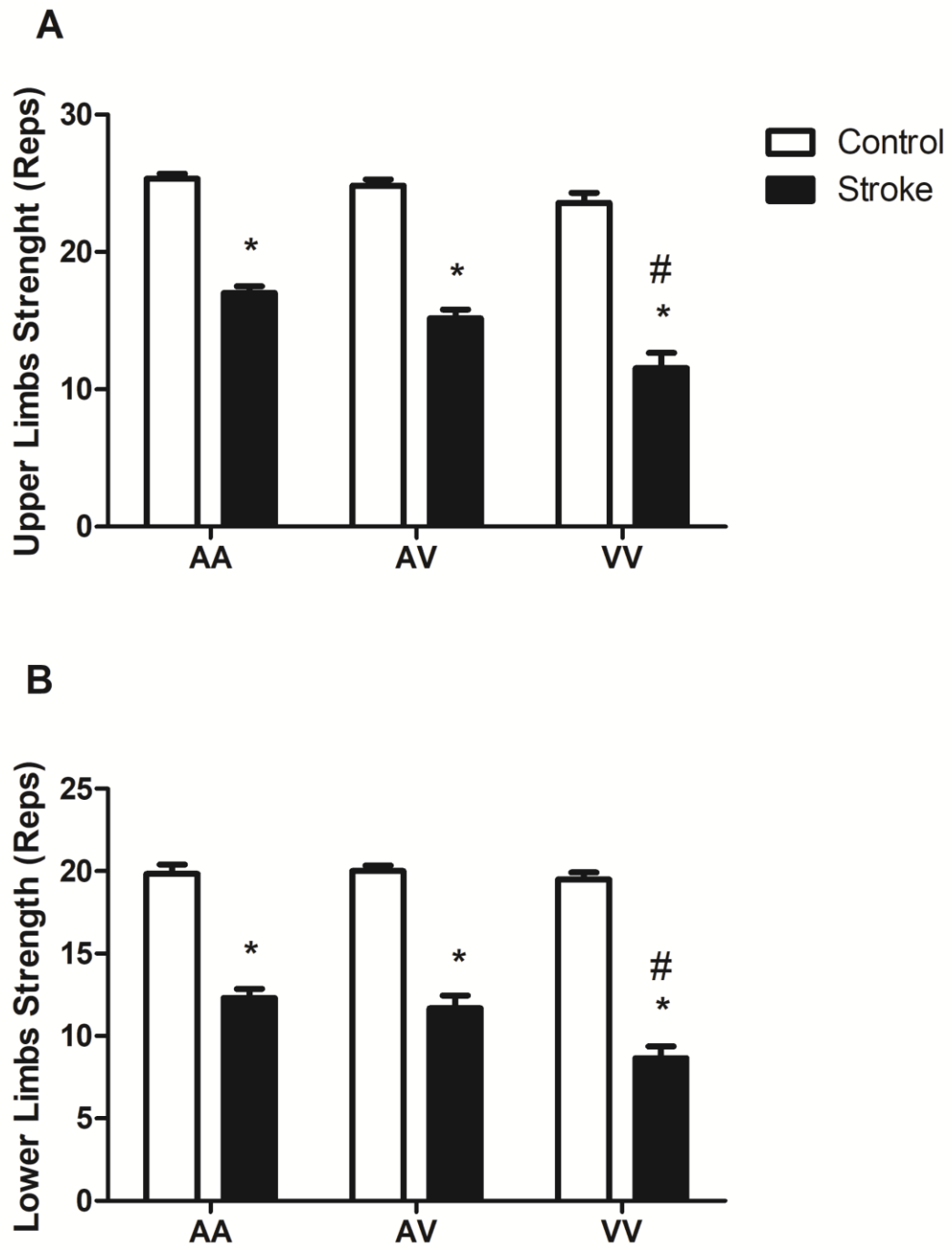


Figure 2

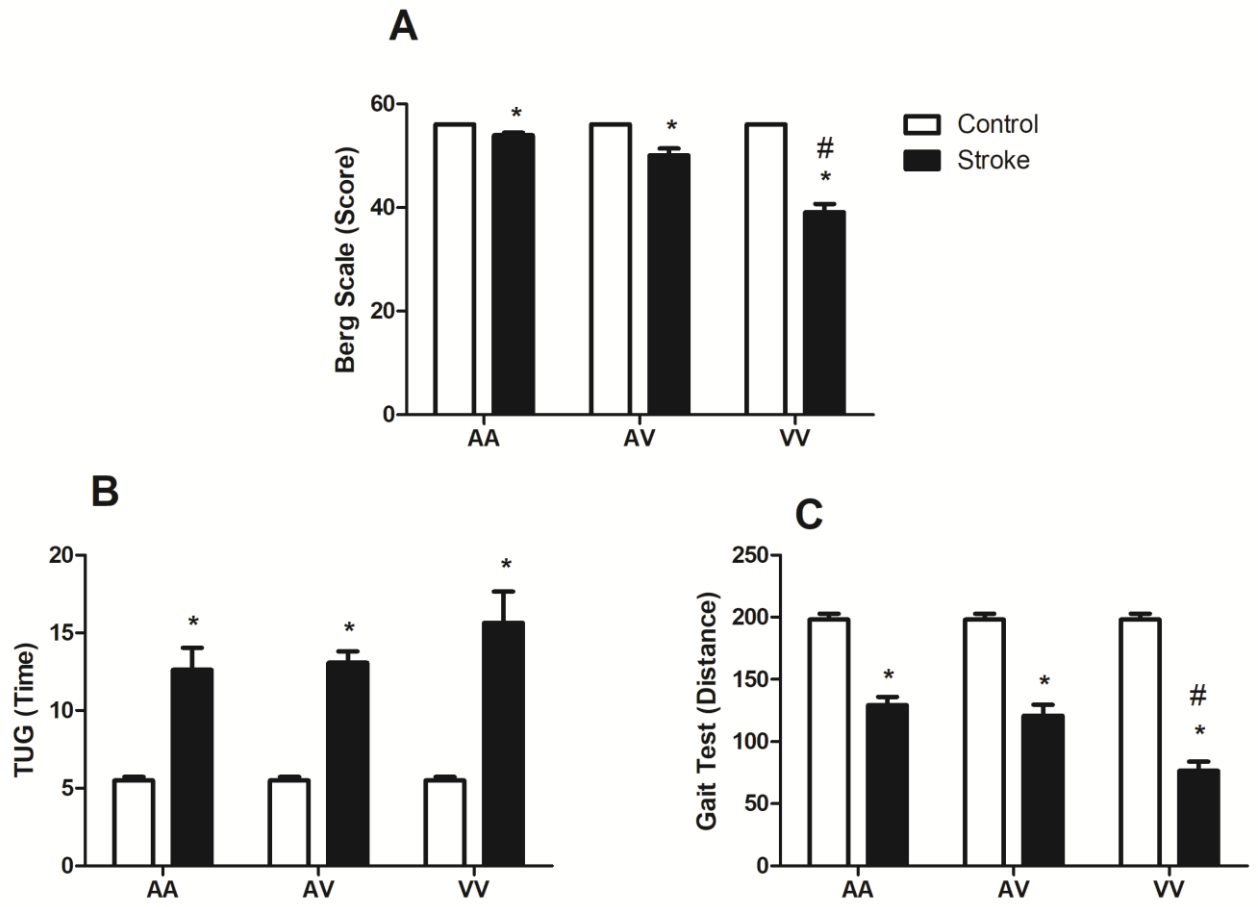


Table 1 - Baseline characteristics of study subjects.

Characteristic	Stroke Group (48)	Control Group (50)	<i>p Value</i>
Age	66 ± 2.1	58 ± 1.6	>0.05
Male (%)	70.5	61	>0.05
BMI (Kg/ m ²)	27.3 ± 0.3	23.4 ± 0.4	<0.0001
Hypertension (%)	78	0	<0.0001
Smokers (%)	8	0	>0.05
Sedentary (%)	55.5	0	<0.05
Glucose (mg/dl)	100.8 ± 4.2	78.5 ± 1.1	<0.001
Cholesterol (mg/dl)	178.5 ± 7.9	153.5 ± 2.2	<0.0001
HDL (mg/dl)	48.0 ± 2.1	53.2 ± 1.4	>0.05
LDL (mg/dl)	116 ± 8.3	73.6 ± 2.5	<0.001
Triglycerides (mg/dl)	155.1 ± 9.5	106.2 ± 6.1	<0.001

Baseline characteristics of the study subjects. Data are expressed as mean ± standard error of the mean (SEM) or percentage. Significant values = $p < 0.05$. BMI = Body Mass Index, AP = Alkaline Phosphatase.

Table 2: Neuropsychological test of study subjects according to genotypes.

Neuropsychological Test	Control			Stroke		
	AA	AV	VV	AA	AV	VV
Memory Tests						
Working Memory	1.78 ± 0.20	1.63 ± 0.43	1.36 ± 0.11	1.09 ± 0.29	1.06 ± 0.14	0.04 ± 0.38*#
Verbal Memory	-0.38 ± 0.17	-0.26 ± 0.23	-0.57 ± 0.24	-1.08 ± 0.66	-0.51 ± 0.68	-0.75 ± 0.51
Long-Term Semantic Memory	0.50 ± 0.39	0.42 ± 0.65	0.14 ± 0.32	-0.02 ± 0.18	0.08 ± 0.23	-0.30 ± 0.36
Short-Term Visual Memory	0.23 ± 0.01	0.23 ± 0.02	0.21 ± 0.0	0.10 ± 0.13	-0.32 ± 0.54	-0.13 ± 0.41
Prospective Memory	0.54 ± 0.01	0.52 ± 0.03	0.48 ± 0.03	-0.06 ± 0.44	0.001 ± 0.3	-0.20 ± 0.35
Total Memory	1.27 ± 0.14	0.59 ± 0.17	0.41 ± 0.15	0.35 ± 0.31	0.37 ± 0.32	-0.75 ± 0.29*#
Temporal-Spatial						
Orientation	0.28 ± 0.0	0.29 ± 0.0	0.29 ± 0.0	-0.20 ± 0.57	-0.01 ± 0.45	-0.35 ± 0.44
Attention						
Inverse Count	0.19 ± 0.01	0.17 ± 0.0	0.17 ± 0.0	0.13 ± 0.11	0.08 ± 0.10	0.12 ± 0.10
Digits repetition	1.04 ± 0.12	1.11 ± 0.10	0.80 ± 0.15	0.37 ± 0.23	0.43 ± 0.18	0.35 ± 0.24
Total attention	0.73 ± 0.07	0.76 ± 0.05	0.50 ± 0.10	0.47 ± 0.33	0.41 ± 0.28	0.43 ± 0.39
Perception						
	0.20 ± 0.32	0.35 ± 0.40	0.28 ± 0.35	0.08 ± 0.32	-0.27 ± 0.38	-0.44 ± 0.31
Language						

Oral language	0.41 ± 0.14	0.55 ± 0.0	0.40 ± 0.14	0.27 ± 0.47	0.32 ± 0.29	0.19 ± 0.36
Written language	0.32 ± 0.19	0.50 ± 0.29	0.40 ± 0.19	0.23 ± 0.22	0.27 ± 0.22	-0.23 ± 0.24
Total language	0.62 ± 0.12	0.52 ± 0.22	0.51 ± 0.15	0.49 ± 0.29	0.43 ± 0.06	-0.29 ± 0.22
Praxes	0.97 ± 0.19	1.01 ± 0.15	0.97 ± 0.13	0.60 ± 0.50	0.53 ± 0.19	0.25 ± 0.41
Executive Function						
Total verbal fluency	0.18 ± 0.20	-0.05 ± 0.17	0.20 ± 0.23	-0.49 ± 0.38	-0.37 ± 0.29	- 0.65 ± 0.20
Problems Resolution	0.24 ± 0.11	0.25 ± 0.15	0.34 ± 0.0	0.11 ± 0.38	0.10 ± 0.20	0.08 ± 0.33

Neuropsychological tests according to genotype. Data are expressed as mean ± standard error of the mean (SEM). *P<0.05 was considered significant as compared AA, AV and VV stroke groups with VV, AV and AA control groups. #P<0.05 as compared VV stroke with AA and AV stroke groups.

Table 3: The levels of BDNF and ACh in Control and Stroke groups according to genotypes.

Biomarker	Control			Stroke		
	AA	AV	VV	AA	AV	VV
BDNF (pg/ml)	32.18±0.88	22.10±1.20	17.71±0.65	24.04±0.74*	15.46±0.48*	10.08±0.57*#
ACh (µg/L)	37±1.08	37.21±1.42	27.69±3.03	21±1.87*	13.53±1.19*	7.09±0.61*#

The levels of BDNF and ACh. Data are expressed as mean ± standard error of the mean (SEM). *P<0.05 was considered significant as compared AA, AV and VV stroke groups with VV, AV and AA control groups. #P<0.05 as compared VV stroke with AA and AV stroke groups.

4. DISCUSSÃO

No presente estudo mostramos que o polimorfismo da Ala16Val MnSOD, especificamente, o genótipo VV, foi mais prevalente em indivíduos com AVEi. Além disso, os pacientes com este genótipo apresentaram piores desempenhos nos testes cognitivos e motores quando comparados aos indivíduos saudáveis e aos pacientes com genótipo AA e AV. Interessantemente, os pacientes com genótipo VV apresentaram maiores níveis de TNF- α , NOx, caspases, dano ao DNA, assim como, níveis reduzidos de BDNF e ACh, sugerindo que este polimorfismo pode ser um fator agravante da doença nesta população. Para nosso conhecimento, este é o primeiro estudo a investigar a influência da Ala16Val MnSOD no AVEi e sua relação com a piora nas funções motoras e cognitivas associadas a mudanças nos parâmetros laboratoriais. Neste sentido, este estudo reforça a necessidade atual de entender as influências genéticas associadas aos fenótipos, e sugere uma possível relação com o AVE.

O estresse oxidativo é uma condição onde ocorre um desequilíbrio entre a produção das ERs e a capacidade de eliminação destas espécies pelo sistema antioxidante. Normalmente o O₂, após sua utilização na fosforilação oxidativa em nível mitocondrial, é reduzido à H₂O, entretanto, reduções parciais de O₂, levam à formação de EROs, como O₂⁻, o H₂O₂ e o OH⁻ e ERNs, como o ONOO⁻ pela reação com óxido nítrico (NO) (HEEBA e EI-HANAFY, 2012). Estas ERs podem causar danos aos lipídios, proteínas e ao DNA, levando à uma sinalização de eventos em cascata descendente ou favorecer à apoptose (FINKEL, 1998; THANNICKAL e FANBURG, 2000).

Enquanto níveis fisiológicos de ERs podem ser eliminados por um sistema antioxidante enzimático e não-enzimático eficiente (NAVARRO e BOVERIS, 2008), nos casos de desequilíbrio na produção destas espécies, a ação deste sistema se torna comprometida (HALLIWELL e WHITEMAN, 2004). Entre as enzimas componentes do sistema antioxidante, a MnSOD está presente na mitocôndria e é a primeira em uma cadeia enzimática que medeia a formação de EROs gerados pela redução parcial de O₂ (LI e ZHOU, 2011), sendo a MnSOD que degrada o O₂⁻ em H₂O₂, o qual será posteriormente convertido em água (H₂O) pelas demais enzimas do sistema (CHEN et al, 2011).

Embora as EROs apresentem papéis fisiológicos relevantes, o aumento das concentrações que levam ao estresse oxidativo têm sido relacionado a várias condições patológicas (SIMS e MUYDERMAN, 2010) como o AVE (PASCOTINI et al., 2015). Isto ocorre principalmente devido ao cérebro ser especialmente propenso a danos mediados pelas espécies reativas, que está relacionado ao alto consumo de O_2 , ácidos graxos poli-insaturados e presença de metais de transição, e a redução das defesas antioxidantes (LESZESK et al., 2016). Nesse sentido, estudos mostram que a falência das defesas antioxidantes, como a MnSOD agrava o infarto cerebral após isquemia (HUANG et al., 2012) e o polimorfismo Ala16Val MnSOD está associado a um risco aumentado de doença vascular (DUARTE et al., 2010). Na verdade, a MnSOD tem sido considerada um alvo terapêutico eficaz na prevenção isquêmica (HUANG et al., 2012). Assim, nossos dados corroboram com essa ideia desde que nós mostramos que o polimorfismo da MnSOD está relacionado com as condições patológicas do SNC, como no AVE, uma vez que o aumento do genótipo VV foi observado nesses pacientes. Dessa forma, é possível que o acúmulo de O_2 possa conduzir a uma desestabilização mitocondrial, ativação da via inflamatória e da cascata de apoptose celular (WATTS et al., 2013).

Então, as mudanças na estabilidade mitocondrial, resultando na liberação de proteínas, são fundamentais para a ativação da via intrínseca apoptótica. No SNC, estas proteínas levam à ativação de caspase-3, que por sua vez induz a danos celulares, tais como a fragmentação do DNA (GALLUZZI et al., 2007; KROEMER et al., 2009) Além disso, os ânions superóxidos ativam as caspases em vários tecidos, tais como fígado e células endoteliais (CONDE DE LA ROSA et al., 2006, PARK et al., 2010); e tem a sua atividade inibida pela ação da SOD. Mais especificamente, foi mostrado que a MnSOD pode diminuir o volume do infarto, dano tecidual e apoptose cerebral em um modelo de oclusão da artéria cerebral média, que foi relacionado com a diminuição da caspase 3. Este efeito foi parcialmente explicado por um papel protetor mediado pela MnSOD após uma isquemia permanente (HUANG et al., 2012). Em nosso estudo, vimos o aumento das caspases 8 e 3 em pacientes VV, provavelmente devido a uma desestabilização mitocondrial e um aumento na liberação de fatores inflamatórios, o que pode provocar danos nas células e induzir a apoptose (CERNE et al., 2013).

Nesse contexto, os resultados deste estudo mostraram que os indivíduos que sofreram AVE configuram o maior percentual da genotipagem VV, e ainda que estes

sujeitos mostraram níveis elevados de fatores inflamatórios como o TNF- α e AChE em relação aos genótipos AA e AV, bem como, níveis menores na relação com estes genótipos quanto aos níveis de ACh.

De fato, a inflamação é uma resposta complexa à estímulos danosos ao corpo, como os danos teciduais, patógenos, dano autoimune, isquemia, entre outros. (NATHAM, 2002). Inúmeras células e moléculas associadas à inflamação removem estes estímulos danosos e reparam os danos teciduais. Este processo de cura inclui a destruição de “elementos estranhos” e o auto-reparo dos tecidos. Se esta destruição associada ao reparo programado não ocorre corretamente, os danos inflamatórios podem persistir ou, até mesmo intensificarem-se, dando origem à novas ou patologias ou à reincidência de anteriores (LENNARD-JONES, 1989; AKIYAMA et al, 2000). Os O_2^- têm papéis pró-inflamatórios, causando peroxidação lipídica e oxidação, dano ao DNA, formando o ONOO $^-$ e recrutando neutrófilos para os locais de inflamação. (DEITCH et al, 1990; DROY-LEFAIX et al, 1991; SALVEMINI et al, 1996). Desta forma, por sua ação eliminando os O_2^- , a MnSOD pode ser considerada também como um agente com propriedades anti-inflamatórias (LI e ZHOU, 2011).

Importantemente, a expressão de MnSOD é regulada em locais de inflamação por EROs e mediadores pró-inflamatórios (WONG e GOEDDEL, 1988; TSAN et al., 2001). Esta modulação inflamatória regula positivamente a expressão da MnSOD, que por sua vez regula negativamente a inflamação por supressão do NF- κ B. Além disso, as citocinas, tais como TNF- α , pode estimular a expressão de mRNA da MnSOD na tentativa de conter a inflamação (WONG e GOEDDEL, 1988). Dessa forma, a atividade aumentada da MnSOD (DUARTE et al., 2010; SUTTON et al., 2003) pode ser um reflexo de uma retroalimentação parcialmente conduzida pelas citocinas inflamatórias observadas nos pacientes com AVE. Entretanto, aqueles indivíduos com o alelo V, tem a MnSOD menos eficaz em 30-40% em relação ao alelo A, sugerindo dessa forma que a redução da efetividade da MnSOD, pode falhar na supressão de fatores de transcrição inflamatórios (SUTTON et al., 2003), contribuindo para o aumento da inflamação e danos celulares como aqueles observados nos pacientes desse estudo, principalmente nos portadores do alelo V.

Dados recentes indicam que existe uma estreita relação entre MnSOD, inflamação e BDNF (HE e KATUSIC, 2012). Em células angiogênicas, He e Katusic (2012) encontraram que a inibição de NF κ B bloqueou a regulação da MnSOD

induzida por BDNF, indicando que a sinalização de NFkB pode contribuir parcialmente para o aumento da atividade da MnSOD em relação ao BDNF. Além disso, esses achados também sugerem uma relação entre BDNF e mitocôndria, o que pode parcialmente ocorrer devido a modulação inflamatória (MARKHAM et al., 2014). Outro dado interessante, é que o TNF- α pode atuar nos seus respectivos receptores (PARK e BOWERS, 2010) e causar a ativação de NFkB, um fator de transcrição que migra para o núcleo da célula e pode promover elevadas concentrações de cálcio intracelular, assim como a produção de espécies reativas (NATHAN e XIE, 1994; HEMMENS e MAYER, 1998). Estes radicais livres podem induzir uma disfunção celular, resultando na ativação de caspases, tais como as caspases-8 e -3, e conseqüentemente, causando dano no DNA (SUGAWARA et al., 2004).

De fato, em resposta a quadros inflamatórios e infecciosos causados por diversas patologias, entre elas o AVE, ocorre a liberação do TNF- α e a sua ligação a seus receptores específicos (BAUND e KARIN, 2001). Assim, o TNF- α pode ativar diferentes vias sinalizadoras, entre elas, a via apoptótica (PARK e BOWERS, 2010). Nesse sentido, níveis aumentados de TNF- α podem resultar em ligações em maior número com seus receptores, conduzindo a ativação das caspases executoras, como a CASP 8 por meio da via apoptótica extrínseca (MICHEAU e TSCHOPP, 2003; SCHNEIDER-BRACHERT et al., 2004), e assim resultar na ativação da CASP 3, culminando no dano ao DNA (CHEN et al, 1998), pela ativação da CAD e a clivagem de diversos substratos proteicos como a PARP (SUGAWARA et al., 2002). Esses dados corroboram com nossos resultados desde que encontramos um aumento nos níveis de TNF- α , CASP 3 e dano ao DNA.

Por outro lado, a CASP 8 também desencadeia a via apoptótica intrínseca, por meio da clivagem dos membros da família dos fatores pró-apoptóticos Bcl-2, iniciando o processo apoptótico induzido pela mitocôndria (GROSS et al, 1999; ZHAO et al, 2001). Seguido destes eventos há a indução a um aumento subsequente de espécies reativas e liberação de fatores apoptogênicos mitocondriais, tais como citocromo c, para o citosol. Liberado o citocromo c, junto com dATP e o fator-1 de ativação de protease apoptótica (Apaf-1) formam o apoptosoma, que por sua vez recruta e ativa a caspase-9, finalmente levando a ativação da CASP 3 e conseqüente disfunção celular (NAMURA et al., 1998; BUDIARDJO, et al., 1999; GRAHAM, 2001; LIOU et al, 2003).

Considerando que o TNF- α reduz níveis de BDNF e assim colabora com a ativação das caspases, podemos propor que estes dados podem explicar os resultados encontrados em nosso estudo. Também é importante mencionar que BDNF desempenha um papel importante na proteção neuronal e neurogênese no AVEi, o que corrobora a sua relevância neste estudo (ARUMUGAM et al., 2010; BÉJOT et al., 2011; GAO et al., 2010; PLOUGHMAN et al., 2009). Além disso, foram encontrados níveis séricos diminuídos de BDNF correlacionados com os níveis reduzidos de BDNF no encéfalo (PLOUGHMAN et al., 2009).

A ACh é um neurotransmissor com propriedades anti-inflamatórias, uma vez que é capaz de suprimir a produção de citocinas pró-inflamatórias (KAWASHIMA e FUJI, 2003), enquanto a AChE é uma enzima envolvida em funções imune, expressa nos linfócitos T e que tem como função promover a hidrólise da ACh para colina e acetato (SKOK et al, 2007). Algumas pesquisas já mostraram ligação entre as rotas inflamatórias e a sinalização colinérgica (METZ e TRACEY, 2005; SHAKED et al., 2009; BEN-ASSAYAG et al, 2010).

As vias colinérgicas anti-inflamatórias inibem a síntese e liberação de citocinas através da ativação do receptor de ACh (HEJMADI et al, 2003). Alguns estudos demonstram uma inter-relação entre as reações inflamatórias e a capacidade de hidrólise de ACh, de forma que o aumento nesta capacidade pode ter sido induzido pelo estresse, e assim, acentuar a resposta inflamatória ao AVE (KAUFER et al., 1998), principalmente, como observamos em nossos resultados, nos pacientes portadores do genótipo VV. Neste sentido um aumento da atividade da AChE pode aumentar a proliferação de linfócitos e a secreção de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α , e então colaborar para o processo inflamatório, diminuindo a concentração de ACh no espaço extracelular (REARDON et al, 2013).

Observamos em nossos achados que os pacientes pós-AVE apresentaram níveis de ACh e BDNF menores em relação ao grupo controle, e que aqueles pacientes com genótipo VV, estes valores eram ainda mais baixos, sugerindo a atuação do polimorfismo Ala16Val da MnSOD como um agravante neste quadro, além de que alguns estudos demonstram relações importantes entre a memória e as funções motoras com os níveis colinérgicos (ACh e AChE) e de fatores neurotróficos como o BDNF (SCALZO et al, 2010; ZHAO-HUI et al, 2012; DIEF et al 2015).

O BDNF é uma neurotrofina, membro da família das de fatores de crescimento, responsável pela modulação da plasticidade do sistema nervoso

central durante a aprendizagem e a recuperação das habilidades motoras (HELM et al, 2015). É o fator de crescimento mais bem distribuído no encéfalo, tendo influência na função e sobrevivência de diversas populações neuronais e sistemas de neurotransmissão (NILSSON et al, 1998). Trata-se de um fator envolvido na neuroproteção, neurogênese e neuroplasticidade, e vem sendo identificado como tendo um papel chave na mediação do aprendizado motor e na reabilitação pós-AVE (HASSELMO, 2006).

Recentes avanços no entendimento do papel do BDNF na neuroplasticidade podem ter fornecido informações importantes no desenvolvimento de novas estratégias de reabilitação pós-AVE (VANDERBERG et al, 2004; PLOUGHMAN et al, 2009; KNAEPEN et al, 2010).

Estes efeitos benéficos são induzidos através do TrkB, um receptor do BDNF. A primeira rota ativada envolve a 3-fosfatidilinositida quinase (PI3K) e a proteína quinase B (Akt). BDNF diminui a apoptose (YAO et al, 2012) e induz a reconexão funcional das sinapses hipocâmpais (FANG et al, 2013). A segunda rota é a da quinase relacionada ao sinal extracelular de TrkB (ERK), a qual media a plasticidade e o crescimento neuronal (DING et al, 2011).

Desta forma, sua relação com a neuroplasticidade é bem documentada, e em nossos resultados observamos o decréscimo nos níveis desta neurotrofina nos pacientes pós-AVE, principalmente naqueles com o alelo V, assim como para esta mesma população nós observamos os piores resultados para as análises de memória e de funcionalidade.

Além das propriedades inflamatórias, a rota colinérgica central, no hipocampo, atua de forma importante na regulação de numerosas funções vitais, incluindo a memória, o aprendizado e o movimento (COYLE et al, 1983).

Estudos mostram que bloqueios de receptores colinérgicos muscarínicos prejudicam a aquisição de novas memórias, porém não afetam as memórias previamente estabelecidas (ATRI et al, 2004; HASSELMO e MCGAUGHY, 2004), e também podem prejudicar a memória de trabalho estimulada (GREEN et al, 2005).

Outra importante função da ACh tem relação com a função muscular, uma vez que no sistema nervoso somático a contração muscular ocorre pela liberação deste neurotransmissor pelas ramificações axonais (DIEF et al, 2015).

Neste sentido o papel da acetilcolina pode ser importante nos possíveis déficits cognitivos e motores consequentes de patologias neurodegenerativas como

o AVE. Em nossos resultados, observamos que os resultados mais deficitários nos testes de memória (trabalho e total) e função motora (escala de equilíbrio de Berg e o teste STF) foram apresentados pelos pacientes pós-AVE com o genótipo VV.

Em seu estudo, Kim et al (2013) demonstrou que um polimorfismo do BDNF, o Val66Met, que reduz a atividade do BDNF dependente do genótipo, apresentou uma relação com a piora na memória e na função motora em pacientes que sofreram AVE. Ainda, outros estudos têm demonstrado que a expressão do BDNF está relacionada com a recuperação cognitiva e motora pós-AVE, assim como uma expressão deficitária desta neurotrofina pode agravar os déficits nestes aspectos no AVE (COOK et al, 2012; ZHANG et al, 2012; RAVINA et al, 2018).

Como visto anteriormente, estudos recentes têm apontado uma relação próxima entre a expressão da enzima Mn-SOD e o BDNF (HE e KATUSIC, 2012; PASCOTINI et al, 2015), indicando que a sinalização através do BDNF pode contribuir, pelo menos em parte, para o aumento na expressão da Mn-SOD (HE e KATUSIC, 2012; RAVINA et al, 2018). Além disso, outros estudos também têm demonstrado uma relação entre o sistema colinérgico e o BDNF nas funções motoras e cognitivas, a partir do fato que o BDNF pode promover a taxa de sobrevivência e crescimento dos grânulos colinérgicos e motores, assim como os neurônios colinérgicos do prosencéfalo (MCALLISTER, 2001; MURER et al, 2001).

De fato, o BDNF tem um importante papel como suporte no trofismo dos neurônios colinérgicos, regulando seu tamanho, inervação e diferenciação durante seu desenvolvimento (CROWLEY et al 1994; MCALLISTER, 2001). O BDNF pode, também, potencializar a maturação dos neurônios colinérgicos (YUEN et al, 1996) e alguns estudos têm demonstrado um feedback positivo entre a atividade colinérgica e neurotrofinas como o BDNF (YUEN et al, 1996; WARD e HAGG, 2000).

Além disso, no sistema colinérgico central, estudos sobre inibidores convencionais da AChE têm demonstrado que a inibição desta enzima pode regular positivamente o BDNF (LINDEFORS et al, 1992; DA PENHA et al, 1993; BETANCOURT et al, 2007). Na sequência, no estudo de Gaydukoy et al, 2019, foi sugerida uma correlação entre o BDNF e a ACh nas funções motores, uma vez que aquela neurotrofina facilitaria a transmissão sináptica em junções neuromusculares maduras e recém formadas em ratos através da potencialização do transportador vesicular de ACh.

5 Conclusão

Finalmente, os resultados apresentados neste estudo sugerem uma possível rota oxidativa-nitrosativa, inflamatória, apoptótica e de dano ao DNA, associada a níveis reduzidos de BDNF, nos pacientes com AVE crônico, principalmente naqueles com o alelo V do polimorfismo da MnSOD (AV e VV). Estes dados sugerem um importante papel do BDNF na manutenção do equilíbrio oxidativo após o acometimento do AVE, contribuindo na diminuição da resposta inflamatória e apoptótica. Desta forma, estes resultados corroboram com estudos prévios que demonstraram que outros polimorfismos genéticos estão relacionados ao desenvolvimento do AVE e, assim, indicando que o entendimento das interações genéticas pode ser a chave para prevenção, tratamento e, quem sabe, até evitar o acometimento da patologia.

Além disso, observamos uma associação do polimorfismo Ala16Val da MnSOD com a piora das funções cognitivas e motoras nos pacientes que sofreram AVE. Estes achados relacionam estes déficits clínicos com os níveis diminuídos de BDNF e ACh, principalmente naqueles com o genótipo VV. Assim, informações sobre os genótipos deste polimorfismo podem ajudar no esclarecimento sobre o tipo e a magnitude das consequências clínicas, e contribuir como guia na prescrição de um tratamento individualizado mais adequado para reabilitação cognitiva e motora após o AVE.

Referências

- AKIYAMA, H. et al., Inflammation and Alzheimer's disease. **Neurobiology of Aging**, v. 21, n. 3, p. 383–421, 2000.
- AL-BAHRANI, A. et al. TNF-alpha and IL-8 in acute stroke and the modulation of these cytokines by antiplatelet agents. **Curr Neurovasc Res** 4(1):31–37, 2007.
- AMES, B.N.; HAGEN, T.M.; SHIGENAGA, M.K et al. Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions. **Mayo Clin Proc.** 1988; 63:381-9. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Nov 8;91(23):10771-8.
- ARUMUGAM, T.V. et al. Age and energy intake interact to modify cell stress pathways and stroke outcome. **Ann. Neurol.**, v. 67, n. 1, p. 41-52, 2010. doi: 10.1002/ana.21798.

ASSAYAG, B. E. et al. Serum cholinesterase activities distinguish between stroke patients and controls and predict 12-month mortality. **Mol Med** 16(7-8) 278-286, 2010.

ATRI A. et al. Blockade of central cholinergic receptors impairs new learning and increases proactive interference in a word paired-associate memory task. **Behav. Neurosci.** v. 118, p. 223–236, 2004. [PubMed: 14979800].

BAHAR-FUCHS, A.; CLARE, L.; WOODS, B. Cognitive training and cognitive rehabilitation for persons with mild to moderate dementia of the Alzheimer's or vascular type: a review. *Alzheimer's*. **Res Ther** 2013;5:35.

BANATI, R. B. et al. Cytotoxicity of microglia. **GLIA**, vol. 7, no. 1, pp. 111–118, 1993.

BARONE, F. C. et al. Tumor necrosis factor-alpha. A mediator of focal ischemic brain injury. **Stroke** 28(6):1233–1244, 1997.

BAUND, V.; KARIN, M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. **Trends Cell Biol** 11(9):372–377, 2001.

BECKMAN, J. S. et al. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. **Proc Natl Acad Sci U S A** 87: 1620–1624, 1990.

BÉJOT, Y. et al. Circulating and brain BDNF levels in stroke rats. Relevance to clinical studies. **PLoS One.**, v. 6 n. 12, e29405, 2011. doi: 10.1371/journal.pone.0029405. Epub 2011 Dec 16.

BELDA-LOUIS, J. M. et al. Rehabilitation of gait after stroke: a review towards a top-down approach. **Journal of NeuroEngineering and Rehabilitation**, v. 8, p. 66, 2011.

BEN-ASSAYAG E. et al. Serum cholinesterase activities distinguish between stroke patients and controls and predict 12-month mortality. **Mol. Med.**, v. 16, p. 278-286, 2010.

BENEDICTO, O. C. et al. Biochemical evaluation of focal non-reperfusion cerebral ischemia by middle cerebral artery occlusion in rats. **Arq Neuropsiquiatr**; 66(3-B):725-730, 2008.

BETANCOURT, A.M.; FILIPOV, N.M.; CARR, R.L. Alteration of neurotrophins in the hippocampus and cerebral cortex of young rats exposed to chlorpyrifos and methyl parathion. 2007 **Toxicol Sci** 100: 445-455.

BINDOKAS, V. P. et al. BINDOKAS V. P. et al. BINDOKAS V. P. et al. BINDOKAS V. P. et al. Visualizing superoxide production in normal and diabetic rat islets of Langerhans. **J Biol Chem.** Mar 14;278(11):9796-801, 2003.

- BRADHAM, C. A.; QIAN, T.; STREETZ, K.; et al. The mitochondrial permeability transition is required for tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis and cytochrome c release. **Mol Cell Biol.** 1998 Nov;18(11):6353-64.
- BREDER, J. et al. Inhibition of different pathways influencing Na(+) homeostasis protects organotypic hippocampal slice cultures from hypoxic/hypoglycemic injury. **Neuropharmacology.** 2000 Jul 24;39(10):1779-87.
- BRESCIANI G. et al. The MnSOD Ala16Val SNP: relevance to human diseases and interaction with environmental factors. **Free Radic Res** 2013, v.47, n.10, p.781-792.
- BROUGHTON, B. R.; REUTENS, D. C.; SOBEY, C. G. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. **Stroke**, v. 40, p. 331–339, 2009.
- BRUCK, I. et al. Cerebellar vermishypoplasia – non progressive congenital ataxia. **Arq. Neuro-Psiquiatr.**, v. 58, n. 3-B, p. 897-900, 2000.
- BUDIARDJO I. et al. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v. 15, p. 269-90, 1999.
- CERNE, J.Z. et al. Estrogen metabolism genotypes, use of long-term hormone replacement therapy and risk of postmenopausal breast cancer. **Oncol. Rep.**, v. 26, p. 479-485, 2011.
- CHAMORRO, A.; HALLENBECK, J. The harms and benefits of inflammatory and immune responses in vascular disease. **Stroke**, v. 37, p. 291–293, 2006.
- CHAN, P.H. Role of oxidants in ischemic brain damage. **Stroke** 27: 1124–1129, 1996.
- CHAN, P.H. Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v. 21, p. 2–14, 2001.
- CHANDER, R. J.; LAM, B. Y.; LIN, X. et al. Development and validation of a risk score (CHANGE) for cognitive impairment after ischemic stroke. **Sci Rep** 2017;7:12441.
- CHEN, H. et al. Oxidative stress in ischemic brain damage: mechanisms of cell death and potential molecular targets for neuroprotection. **Antioxidants and redox signaling**, v. 14, n. 8, 2011.
- CHEN J. et al. **Induction of caspase-3-like protease may mediate delayed neuronal death in the hippocampus after transient cerebral ischemia.** *J Neurosci*18:4914–4928, 1998.
- CHERUBINI, A. et al. Potential markers of oxidative stress in stroke. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 39, n. 7, p. 841–852, 2005.
- CONDE DE LA ROSA, L. et al. Superoxide anions and hydrogen peroxide induce hepatocyte death by different mechanisms: Involvement of jnk and erk map kinases. **J. Hepatol.**, v. 44, p. 918-929, 2006.

COOK, D.J.; NGUYEN, C.; CHUN, H.N. et al. Hydrogel-delivered brain-derived neurotrophic factor promotes tissue repair and recovery after stroke. **J. Cereb. Blood Flow Metab.** 2012, 37, 1030–1045.

COYLE, J.T.; PRICE, D.L.; DELONG, M.R. Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation. **Science**, v. 219, p. 1184-1190, 1983.

CROWLEY, C.; SPENCER, S.D.; NISHIMURA, M.C. et al Mice lacking nerve growth factor display perinatal loss of sensory and sympathetic neurons yet develop basal forebrain cholinergic neurons. **Cell** 1994, 76: 1001-1011.

CULMSEE C, KRIEGLSTEIN J. **Ischaemic brain damage after stroke: new insights into efficient therapeutic strategies.** EMBO reports 2007; 8:129 – 133.

DA PENHA BERZAGHI, M.; COOPER, J.; CASTREN, E. Cholinergic regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and nerve growth factor (NGF) but not neurotrophin-3 (NT-3) mRNA levels in the developing rat hippocampus. **J Neurosci** 1993, 13: 3818-3826.

DASSONVILLE, P. et al. Cognitive impairments and impact on activities of daily living after minor stroke. **Ann. Phys. Rehabil. Med.**, v. 59, n. 71, 2016. doi: 10.1016/j.rehab.2016.07.165.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol Rev**82: 47–95, 2002.

DEGTEREV, A.; BOYCE, M.; YUAN, J. A decade of caspases. **Oncogene**; 22: 8543–8567, 2003.

DEITCH, E.A. et al. Hemorrhagic shock-induced bacterial translocation: the role of neutrophils and hydroxyl radicals. **Journal of Trauma**, v. 30, n. 8, p. 942–952, 1990.

DIEF, E.A.; SAMY, D.M.; DOWEDAR, F.I. Impact of exercise and vitamin B1 intake on hippocampal brain-derived neurotrophic factor and spatial memory performance in a rat model of stress. **J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)**., v. 61, n. 1, p. 1-7, 2015. doi: 10.3177/jnsv.61.1.

DING, Q.; YING, Z.; GÓMEZ-PINILLA, F. Exercise influences hippocampal plasticity by modulating brain-derived neurotrophic factor processing. **Neuroscience** 2011;192:773-780.

DROY-LEFAIX, M.T. et al. Superoxide dismutase (SOD) and the PAFantagonist (BN 52021) reduce small intestinal damage induced by ischemia-reperfusion. **Free Radical Research Communications**, v. 13, p. 725–735, 1991.

DUARTE, M.M. et al. Oxidative stress in hypercholesterolemia and its association with Ala16Val superoxide dismutase gene polymorphism. **Clin Biochem.**, v. 43, p. 1118-1123, 2010.

ERICKSON, K.I. et al. Brain-derived neurotrophic factor is associated with age-related decline in hippocampal volume. **J. Neurosci.**, v. 30, p. 5368-5375, 2010.

ESPOSTI, M.D. Measuring mitochondrial reactive oxygen species. **Methods**. v. 26, p. 335-340, 2002.

FRANCISCO, G. E. et al. Consensus panel guidelines for the use of intrathecal baclofen therapy in poststroke spastic hypertonia. **Top Stroke Rehabil.**, v. 13 p. 74-85. Review, 2006.

FERRARESE, C. et al. Increased cytokine release from peripheral blood cells after acute stroke. **J Cereb Blood Flow Metab** 19(9):1004–1009, 1999.

FERREIRA ALA, MATSUBARA LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **RAMB**. 1997; 43:61-8.

FINKEL, T. Oxygen radicals and signaling **Current Opinion in Cell Biology**, vol. 10, n. 2, p. 248–253, 1998.

FANG, Z.H.; LEE, C.H.; SEO, M.K. et al. Effect of treadmill exercise on the BDNF-mediated pathway in the hippocampus of stressed rats. **Neurosci Res** 2013;76:187-194.

GALLUZZI, L. et al. Targeting post-mitochondrial effectors of apoptosis for neuroprotection. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1787, p. 402-413, 2009.

GAO, X.Q. et al. Ginsenoside Rb1 regulates the expressions of brain-derived neurotrophic factor and caspase-3 and induces neurogenesis in rats with experimental cerebral ischemia. **J. Ethnopharmacol.**, v. 132, n. 2, p. 393-9, 2010. doi: 10.1016/j.jep.2010.07.033. Epub 2010 Jul 24.

GAYDUKOV, A.; BOGACHEVA, P.; TARASOVA, E. et al. Regulation of Acetylcholine Quantal Release by Coupled Thrombin/BDNF Signaling in Mouse Motor Synapses. **Cells** 2019 Jul 22;8(7). pii: E762. doi: 10.3390/cells8070762.

GOLDSTEIN, L.B. et al. Guidelines for the primary prevention of stroke: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. **Stroke**, v. 42, n. 2, p. 517-84, 2011. doi: 10.1161/STR.0b013e3181fcb238. Epub 2010 Dec 2.

GOMEZ-PINILLA, F.; SO, V.; KESSLAK, J.P. Spatial learning and physical activity contribute to the induction of fibroblast growth factor: neural substrates for increased cognition associated with exercise. **Neuroscience** 1998;85:53-61.

GRAHAM, S. H.; CHEN, J. Programmed cell death in cerebral ischemia. **J Cereb Blood Flow Metab.**, v. 21 p. 99–10, 2001.

GREEN, A. et al. Muscarinic and nicotinic receptor modulation of object and spatial n-back working memory in humans. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 81, p. 575–584, 2005. [PubMed: 15936063].

GRESHAM, G.E., DUNCAN, P.W., STASON, W.B. **Post-Stroke Rehabilitation**. Darby, PA: Diane Publishing; 2004.

GROSS, A. et al. Death and survival signals determine active/inactive conformations of pro-apoptotic BAX, BAD, and BID molecules. **Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.**, v. 64, p. 343-50, 1999.

HÁ, T. T. N. et al. Elevated Levels of Cell-Free Circulating DNA in Patients with Acute Dengue Virus Infection. **PLoS One**, 2011.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals in biology and medicine. 4th ed. Oxford/UK: **Clarendon Press/Oxford Science Publications**; 2007.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 18; p. 125-160, 1995.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **Br J Pharmacol**. 142:231-55, 2004.

HARRIS, N.M.; RITZEL, R.; MANCINI, N.S. et al. Nano-particle delivery of brain derived neurotrophic factor after focal cerebral ischemia reduces tissue injury and enhances behavioral recovery. **Pharmacol BiochemBehav** 2016;150: 48-56.

HASSELMO, M. E. The role of acetylcholine in learning and memory. **Curr Opin Neurobiol**. 2006 December; 16(6): 710–715. doi:10.1016/j.conb.2006.09.002.

HASSELMO M.; MCGAUGHY J. High acetylcholine levels set circuit dynamics for attention and encoding and low acetylcholine levels set dynamics for consolidation. **Progress in Brain Research**, v. 145, p. 207–231, 2004. [PubMed: 14650918].HEEBA, G. H.; EL-HANAFY, A .A. Nebivolol regulates eNOS and iNOS expressions and alleviates oxidative stress in cerebral ischemia/reperfusion injury in rats. **Life Sci**. v. 90, p. 388–395, 2012.

HE, T.; KATUSIC, Z.S. Brain-derived neurotrophic factor increases expression of MnSOD in human circulating angiogenic cells. **Microvasc. Res.**, v. 83, n. 3, p. 366-71, 2012. doi: 10.1016/j.mvr.2012.01.001. Epub 2012 Jan 9.

HEJMADI, M. V. et al. Neuroprotection by nicotine against hypoxia-induced apoptosis in cortical cultures involves activation of multiple nicotinic acetylcholine receptor subtypes. **Mol. Cell. Neurosci**. 24:779–86, 2003.

HELM, A.A. et al. NCAM-deficient mice show prominent abnormalities in serotonergic and BDNF systems in brain - Restoration by chronic amitriptyline. **Eur. Neuropsychopharmacol.**, v. 25, n. 12, p. 2394-403, 2015. doi: 10.1016/j.euroneuro.2015.10.001. Epub 2015 Oct 21.

HELM, E.E.; TYRELL, C.M.; POHLIG, R.T. et al. The presence of a single nucleotide polymorphism in the BDNF gene affects the rate of locomotor adaptation after stroke. **Exp Brain Res**. 2016 Feb;234(2):341-51.

HEMMENS, B.; MAYER, B. Enzymology of nitric oxide synthases. **Methods Mol Biol.**, v. 100, p. 1-32. 1998.

HERBEIN, G.; KHAN, K. A. Is HIV infection a TNF receptor signaling-driven disease? **Trends Immunol** 29(2):61–67, 2008.

HERTZ, L.; PENG, L.; DIENEL, G.A. Energy metabolism in astrocytes: high rate of oxidative metabolism and spatiotemporal dependence on glycolysis/glycogenolysis. **J Cereb Blood Flow Metab**. 2007 Feb;27(2):219-49. Epub 2006 Jul 12.

HIMI, N. et al. Exercise in the early stage after stroke enhances hippocampal Brain-Derived Neurotrophic Factor expression and memory function recovery. **J. Stroke Cerebrovasc. Dis.**, 2016 Sep 14. pii: S1052-3057(16)30289-0. doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2016.08.017.

HINDLE, J.V.; PETRELLI, A.; CLARE, L. et al. Nonpharmacological enhancement of cognitive function in Parkinson's disease: a systematic review. **Mov Disord** 2013;28:1034-1049.

HOSP, J.A.; LUFT A.R. Cortical plasticity during motor learning and recovery after ischemic stroke. **Neural Plast**. 2011;2011: 871296. 2011 Oct 26 [Epub ahead of print]. doi: 10.1155/2011/871296.

HUANG, H.F. et al. Neuroprotection by manganese superoxide dismutase (mnsod) mimics: Antioxidant effect and oxidative stress regulation in acute experimental stroke. **CNS Neurosci. Ther.**, v. 18, p. 811-818, 2012.

HUNZIKER, E.B. Articular cartilage structure in humans and experimental animals. In: KUETTNER K.E., et al. **Articular Cartilage and Osteoarthritis**. New York: Raven Press:183–99, 1992.

JORGENSEN, H.S.; NAKAYAMA, H.; RAASCHOU, H.O. et al. Outcome and time course of recovery in stroke, part II: time course of recovery. The Copenhagen Stroke Study. **Arch Phys Med Rehabil**. 1995;76:406–412.

KAUFER, D. et al. Acute stress facilitates long-lasting changes in cholinergic gene expression. **Nature**. 393:373 7, 1998.

KAWASHIMA, K.; FUJII, T. Extraneuronal cholinergic system in lymphocytes. **Pharmacol Ther**. Apr; 86 (1):29-48, 2000.

- KIM, W.S.; LIM, J.Y.; SHIN, J.H. et al. Effect of the presence of brain-derived neurotrophic factor val(66)met polymorphism on the recovery in patients with acute subcortical stroke. **Ann Rehabil Med.** 2013 Jun;37(3):311-9. doi: 10.5535/arm.2013.37.3.311.
- KESSLAK, J.P.; SO, V.; CHOI, J. et al. Learning upregulates brain-derived neurotrophic factor messenger ribonucleic acid: a mechanism to facilitate encoding and circuit maintenance. **Behav Neurosci** 1998;112:1012.
- KLEIN, J.A.; JONES T.A. Principles of experience-dependent neural plasticity: implications for rehabilitation after brain damage. **J Speech Lang Hear Res.** 2008; 51:S225–S239.
- KNAEPEN, K.; GOEKINT, M.; HEYMAN, E.M. et al. Neuroplasticity exercise-induced response of peripheral brain-derived neurotrophic factor: a systematic review of experimental studies in human subjects. **Sports Med.** 2010;40:765–801.
- KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; BRENNER C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. **Physiol. Rev.**, v. 87, p. 99-163, 2007.
- KUMAR, G. et al. Penumbra, the basis of neuroimaging in acute stroke treatment: current evidence. **J. Neurol. Sci.**, v. 288, p. 13–24, 2010.
- LAZZARO, DI V. et al. BDNF plasma levels in acute stroke. **Neuroscience Letters**, v. 422, p. 128–130, 2007.
- LENNARD-JONES, J.E. Classification of inflammatory bowel disease. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, Supplement, vol. 24, no. 170, p. 2–6, 1989.
- LESZEK J.; BARRETO, G. E.; ALIEV, G. et al. Inflammatory Mechanisms and Oxidative Stress as Key Factors Responsible for Progression of Neurodegeneration: Role of Brain Innate Immune System. **CNS Neurol Disord Drug Targets.** 2016;15(3):329-36.
- LI, C.; ZHOU, H. The role of manganese superoxide dismutase in inflammation defense. **Enzyme Research** Volume 2011, Article ID 387176, 6 pages doi:10.4061/2011/387176.
- LINDEFORS, N.; ERNFORS, P.; FALKENBERG, T.; PERSSON, H. Septal cholinergic afferents regulate expression of brain-derived neurotrophic factor and beta-nerve growth factor mRNA in rat hippocampus. **Exp Brain Res** 1992, 88: 78-90.
- LI G. et al. Cerebrospinal fluid concentration of brain derived neurotrophic factor and cognitive function in non-demented subjects. **PLoS One**, v. 4, p. 5424, 2009.
- LIOU, A. K. et al. To die or not to die for neurons in ischemia, traumatic brain injury and epilepsy: a review on the stress-activated signaling pathways and apoptotic pathways. **Prog Neurobiol**; 69: 103–142, 2003.

LU, Y.; CHRISTIAN, K.; LU, B. BDNF: a key regulator for protein synthesis-dependent LTP and long-term memory? **Neurobiol Learn Mem** 2008, 89(3):312–323. doi:10.1016/j.nlm.2007.08.018.

MANG, C.S. et al. Promoting Neuroplasticity for Motor Rehabilitation Neurotrophic Factor Exercise and Genetic Variation on Brain-Derived After Stroke: Considering the Effects of Aerobic. **Phys Ther.** 2013; 93:1707-1716.

MARKHAM, A. et al. Changes in mitochondrial function are pivotal in neurodegenerative and psychiatric disorders: How important is bdnf? **Br. J. Pharmacol.**, v. 171, p. 2206-2229, 2014.

MARTINS, F. L. M.; GUIMARÃES, L. H. C. T.; VITORINO, D. F. M.; SOUZA, L. C. F. Eficácia da eletroestimulação funcional na amplitude de movimento de dorsiflexão de hemiparéticos. **Revista Neurociências.** v. 12, n. 2, p. 130-9, 2004.

MCALLISTER, A.K. Neurotrophins and neuronal differentiation in the central nervous system. **Cell Mol Life Sci** 58: 1054-1060, 2001.

MCALLISTER, A.K.; KATZ, L.C.; LO D.C. Neurotrophins and synaptic plasticity. **Annu. Rev. Neurosci.**, v. 22, p. 295–318, 1999. [PubMed: 10202541].

METZ, C. N.; TRACEY, K. J. It takes nerve to dampen inflammation. **Nat. Immunol.** 6:756–7, 2005.

MICHEAU, O.; TSCHOPP, J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. **Cell.** Jul 25;114(2):181-90, 2003.

MIRANDA, K. M.; ESPEY, M. G.; WINK, D. A. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. **Nitric Oxide**; 5:62–71, 2001.

MOHD ZULKIFLY, M.F. et al. A Review of Risk Factors for Cognitive Impairment in Stroke Survivors. **Scientific World Journal.** doi: 10.1155/2016/3456943. Epub 2016 May 31. Review.

MONGIN, A.A. Disruption of ionic and cell volume homeostasis in cerebral ischemia: The perfect storm. **Pathophysiology.** 2007 Dec;14(3-4):183-93. Epub 2007 Oct 25.

MORO, M.A.; ALMEIDA, A.; BOLAÑOS, J.P.; LIZASOAIN, I. Mitochondrial respiratory chain and free radical generation in stroke. **Free Radic Biol Med.** 2005; 39:1291-304.

MURER, M.; YAN Q., RAISMAN-VOZARI, R. Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. **Prog Neurobiol** 63: 71-124, 2001.

MURPHY, T. H.; CORBETT, D. Plasticity during stroke recovery: from synapse to behaviour. **Nat Rev Neurosci.** 2009 Dec;10(12):861-72. doi: 10.1038/nrn2735. Epub 2009 Nov 4.

NAGATSU T, SAWADA M. Inflammatory process in Parkinson's disease: role for cytokines. **Curr. Pharm. Des.**, v. 11, p. 999–1016, 2005. [PubMed: 15777250].

NAI-WEN T. et al. Association between oxidative stress and outcome in different subtypes of acute ischemic stroke. **BioMed Research International**, Article ID 256879, 7 pages, 2014.

NAKAJIMA, K.; KOHSAKA, S. Microglia: activation and their significance in the central nervous system. **Journal of Biochemistry**, v. 130, n. 2, p. 169–175, 2001.

NAMURA, S. et al. Activation and cleavage of caspase-3 in apoptosis induced by experimental cerebral ischemia. **J. Neurosci.**, v. 18, p. 3659-3668, 1998.

NATHAN, C. Points of control in inflammation. **Nature**, vol. 420, n. 6917, p. 846–852, 2002.

NATHAN, C.; XIE, Q.W. Nitric oxide synthases: Roles, tolls, and controls. **Cell**. v. 78, p. 915-918, 1994. NAVARATNA, D. et al. Decreased cerebrovascular brain-derived neurotrophic factor-mediated neuroprotection in the diabetic brain. **Diabetes**, v. 60, n. 6, p. 1789-96, 2011.

NAVARRO, A.; BOVERIS, A. Mitochondrial nitric oxide synthase, mitochondrial brain dysfunction in aging, and mitochondria-targeted antioxidants. **Adv Drug Deliv Rev.** ; 60:1534-44, 2008.

NELSON, S. et al. The induction of human superoxide dismutase and catalase in vivo: a fundamentally new approach to antioxidant therapy. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 40, p. 341-347, 2006.

NILSSON, A.S. et al. Neurotrophin-7: a novel member of the neurotrophin family from the zebrafish. **FEBS Lett**, v. 424, p. 285-290, 1998.

NORRVING, B.; KISSELA, B. The global burden of stroke and need for a continuum of care. **Neurology**, v. 15, n. 80, p. 5-12, 2013. doi: 10.1212/WNL.0b013e3182762397.

NUNES, L.C.B.G.; QUEVEDO, A.F.F. **Efeitos da eletroestimulação neuromuscular no músculo tibial anterior de pacientes hemi-paréticos espásticos**. [Dissertação]. Campinas: Unicamp; 2004.

OFEK, K. et al. Cholinergic status modulations in human volunteers under acute inflammation. **J. Mol. Med.** 85:1239–51, 2007.

OLAZARAN, J.; REISBERG, B.; CLARE, L. et al. Nonpharmacological therapies in Alzheimer's disease: a systematic review of efficacy. **Dement Geriatr Cogn Disord** 2010;30:161-178.

Organização Mundial de Saúde. Dados do status global de doenças não-comunicáveis. Geneva, 2010. Disponível em http://www.who.int/nmh/publications/ncd_report_full_en.pdf. Acesso em abr. 2016.

PALMIROTTA, R. et al. Is SOD2 Ala16Val Polymorphism Associated with Migraine with Aura Phenotype? **Antioxidants & Redox Signaling** 2015, Volume 22, Number 3. DOI: 10.1089/ars.2014.6069.

PANDYA, R. S. et al. Central Nervous System Agents for Ischemic Stroke: Neuroprotection Mechanisms. **Cent. Nerv. Syst. Agents Med. Chem.**, v. 11, p. 81–97, 2011.

PARK, K. M.; BOWERS, W.J. **Tumor necrosis factor-alpha mediated signaling in neuronal homeostasis and dysfunction.** *Cell Signal* 22(7):977–983, 2010.

PARK, S. et al. Superoxide is a potential culprit of caspase-3 dependent endothelial cell death induced by lysophosphatidylcholine. **J. Physiol. Pharmacol.**, v. 61, p. 375-381, 2010.

PASCOTINI, E.T. et al. Apoptotic markers and DNA damage are related to late phase of stroke: Involvement of dyslipidemia and inflammation. **Physiol. Behav.** v. 151, p. 369-378, 2015.

PIKULA A, BEISER AS, CHEN TC, PREIS SR, VORGIAS D, DECARLI C, ET AL. Serum brain-derived neurotrophic factor and vascular endothelial growth factor levels are associated with risk of stroke and vascular brain injury: Framingham Study. **Stroke**, v. 44, n. 10, p. 2768-75, 2013.

PLOUGHMAN, M.; WINDLE, V.; MACLELLAN, C.L. et al. Brain-derived neurotrophic factor contributes to recovery of skilled reaching after focal ischemia in rats. **Stroke**. 2009; 40:1490–1495

QU, Y.; ZHUO, L.; LI, N. et al. Prevalence of post-stroke cognitive impairment in China: a community-based, cross-sectional study. **PLoS One**2015;10:e0122864.

RAVINA, K.; BRIGGS, D.I.; KISLAL, S. Intracerebral Delivery of Brain-Derived Neurotrophic Factor Using HyStem[®]-C Hydrogel Implants Improves Functional Recovery and Reduces Neuroinflammation in a Rat Model of Ischemic Stroke. **Int J Mol Sci**. 2018, Nov 28;19(12). pii: E3782. doi: 10.3390/ijms19123782.

REARDON C. et al. Lymphocyte-derived Ach regulates local innate but not adaptive immunity. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 110, p. 1410–5, 2013.

ROMITELLI, F. et al. Comparison of nitrate/nitrite concentration in human plasma and serum samples measured by the enzymatic batch Griess assay, ion-pairing HPLC and ion-trap GC-MS: the importance of a correct removal of a correct removal of proteins in the Griess assay. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**;851:257–67, 2007.

ROY D. et al. Role of reactive oxygen species on the formation of the novel diagnostic marker ischemia modified albumin. **Heart**, v. 92, p. 113-114, 2006.

ROSSI, D.J.; BRADY, J.D.; MOHR, C. Astrocyte metabolism and signaling during brain ischemia. **Nat Neurosci**. 2007 Nov;10(11):1377-86.

ROTHWELL, N.; ALLAN, S.; TOULMOND, S. The role of interleukin 1 in acute neurodegeneration and stroke: pathophysiological and therapeutic implications. **J Clin Invest**. 1997 Dec 1;100(11):2648-52.

SAHA, R.N.; LIU, X.; PAHAN, K. Up-regulation of bdnf in astrocytes by tnf-alpha: A case for the neuroprotective role of cytokine. **J. Neuroimmune Pharmacol.**, v. 1, p. 212-222, 2006

SAMSON, Y.; LAPERGUE, B.; HOSSEINI, H. Inflammation and ischaemic stroke: current status and future perspectives. **Revue Neurologique**, v. 161, n.12, p.1177–1182, 2005.

SALVEMINI D. et al. Evidence of peroxynitrite involvement in the carrageenan induced rat paw edema. **European Journal of Pharmacology**, v. 303, n. 3, p. 217–220, 1996.

SCALZO, P. et al. Serum levels of brain-derived neurotrophic factor correlate with motor impairment in Parkinson's disease. **J. Neurol.**, v. 257, p. 540–545, 2010. DOI 10.1007/s00415-009-5357-2.

SCHMIDT, R.A.; LEE, T.D. Motor Control and Learning: A Behavioral Emphasis. Champaign, IL: **Human Kinetics Publishers**; 2005.

SCHNEIDER-BRACHERT, W. et al. Compartmentalization of TNF receptor 1 signaling: internalized TNF receptors as death signaling vesicles. **Immunity**, v. 21, n. 3, p. 415-28, 2004 .

SHAKED, I. et al. MicroRNA-132 potentiates cholinergic anti-inflammatory signaling by targeting acetylcholinesterase. **Immunity**. 31:965–73 cover. Accompanied by preview O'Neil, L.A.J. Boosting the brain's ability to block inflammation via microRNA-132. *Immunity*. 31:854–5, 2009.

SHICHITA, T.R.; SUZUKI, M.; YOSHIMURA, A. Post-ischemic inflammation in the brain. **Frontier In**, v. 3, Article 132, 2012

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Experimental Physiology**, v. 82, n. 2, p. 291–295, 1997.

SIMS, M.R.; MUYDERMAN H. Mitochondria, oxidative metabolism and cell death in stroke. **Biochim Biophys Acta**. 2010 Jan;1802(1):80-91. doi: 10.1016/j.bbadis.2009.09.003. Epub 2009 Sep 12.

SINGER, V. L. et al. Characterization of PicoGreen reagent and development of a fluorescence-based solution assay for Double-Stranded DNA quantitation. **Anal Biochem**. 249,228 – 238, 1997.

SKOK, M. V. et al. The role of nicotinic receptors in B lymphocyte development and activation. **Life Sci**; 80: 2334–6, 2007.

SOUTHORN, P.A.; POWIS, G. Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions. **Mayo Clin Proc.** 1988; 63:381-9.

STRAUBMEIER, M.; BEHRNDT, E. M.; SEIDL, H. et al. Non-pharmacological treatment in people with cognitive impairment: results from the Randomized Controlled German Day Care Study. **Deutsches €Arzteblatt Int** 2017;114:815.

SUGAWARA, T. et al. Neuronal death/survival signaling pathways in cerebral ischemia. **NeuroRx**, v. 1, p. 17-25, 2004.

SUGAWARA T. et al. Overexpression of copper/zinc superoxide dis-mutase in transgenic rats protects vulnerable neurons against ischemic damage by blocking the mitochondrial pathway of caspase activation. **J. Neurosci.**, v. 22, p. 209–217, 2002.

SUN, J. H.; TAN, L.; YU, J. T. Post-stroke cognitive impairment: epidemiology, mechanisms and management. **Ann Translation Med** 2014;2:1-16.

SUTTON, A. et al. The ala16val genetic dimorphism modulates the import of human manganese superoxide dismutase into rat liver mitochondria. **Pharmacogenetics.** v. 13, p. 145-157, 2003.

TAFANI, M. Cytochrome c-dependent activation of caspase-3 by tumor necrosis factor requires induction of the mitochondrial permeability transition. **Am J Pathol** 156(6):2111–2121, 2000.

THANNICKAL, V.J.; FANBURG, B.L. Reactive oxygen species in cell signaling. **The American Journal of Physiology**, v. 279, n. 6, p. L1005–L1028, 2000.

TSAN, M. F.; CLARK, R. N.; GOYERT, S. M.; WHITE, J. E. Induction of TNF-alpha and MnSOD by endotoxin: role of membrane CD14 and Toll-like receptor-4. **Am J Physiol Cell Physiol.** 2001 Jun;280(6):C1422-30.

TATSCH, E. et al. A simple and inexpensive automated technique for measurement of serum nitrite/nitrate. **Clin Bioq.** 44, 348-350, 2011.

VANDENBERG, P.M.; BRUNEAU, R.M.; THOMAS, N. et al. BDNF is required for maintaining motor map integrity in adult cerebral cortex. **Soc Neurosci Abstr.** 2004;681:5.

VITZTHUM F. et al. A quantitative fluorescence-based microplate assay for the determination of double-stranded DNA using SYBR Green I and a standard ultraviolet transilluminator gel imaging system. **Anal Biochem**; 276,59 – 64, 1999.

YAO, R.Q.; QI, D.S.; YU, H.L. et al. Quercetin attenuates cell apoptosis in focal cerebral ischemia rat brain via activation of BDNF-TrkB-PI3K/Akt signaling pathway. **Neurochem Res** 2012;37:2777-2786.

YOUNG, J.; PIONK, T.; HIATT, I. et al. Environmental enrichment aides in functional recovery following unilateral controlled cortical impact of the forelimb sensorimotor area however intranasal administration of nerve growth factor does not. **Brain Res Bull** 2015;115:17-22.

YUEN, E.C.; HOWE, C.L.; LI, Y., et al. Nerve growth factor and the neurotrophic factor hypothesis. **Brain Dev** 1996, 18: 362-368.

WARD, N.L.; HAGG, T. BDNF is needed for postnatal maturation of basal forebrain and neostriatum cholinergic neurons in vivo. **Exp Neurol** 2000, 162: 297-310.

WARRAICH, Z.; KLEIM, J.A. Neural plasticity: the biological substrate for neurorehabilitation. **PM&R**. 2010;2:S208 –S219.

WATTS, L.T. et al. Stroke neuroprotection: Targeting mitochondria. **Brain Sci.**, v. 3, p. 540-560, 2013.

WESTBROEK, E.M.; PAWLIKOWSKA, L.; LAWTON, M.T. Brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism predicts worse functional outcome after surgery in patients with unruptured brain arteriovenous malformation. **Stroke**. 2012, Aug;43(8):2255-7. doi: 10.1161/STROKEAHA.112.663096. Epub 2012 Jul 5.

WONG, G.H.; GOEDEL, D.V. Induction of manganous superoxide dismutase by tumor necrosis factor: Possible protective mechanism. **Science**. v. 242, p. 941-944, 1988.

WOODRUFF, T.M. et al. Pathophysiology, treatment, and animal and cellular models of human ischemic stroke. **Mol. Neurodegener.**, v. 6, p. 11–29, 2011.

ZELKO, I.N.; MARIANI, J.T.; FOLZ, J.R. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution and expression. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 33, p.337-349, 2002.

ZHANG, F.; YIN, W.; CHEN, J. Apoptosis in cerebral ischemia: executional and regulatory signaling mechanisms. **Neurol Res**; 26:835-845, 2004.

ZHANG, Z.H. et al. Correlations between cognitive impairment and brain-derived neurotrophic factor expression in the hippocampus of post-stroke depression rats. **Mol. Med. Rep.**, 2012, v. 6, p. 889-893.

ZHAO-HUI, Z. et al. Correlations between cognitive impairment and brain-derived neurotrophic factor expression in the hippocampus of post-stroke depression rats. **Molecular Medicine Reports**, v. 6, p. 889-893, 2012.

ZHAO Y, et al. Activation of pro-death bcl-2 family proteins and mitochondria apoptosis pathway in tumor necrosis factor- α -induced liver injury. **J. of Bio. Chem.**, v. 276, N. 29, p. 27422-27, 2001.

ANEXOS

ANEXO I

Questionário Avaliação Clínica

Identificação		
1. SAME:	2. Idade	3.Data:
4. Retorno nº:	5. Procedência:	
6. Escolaridade:		
7. Familiar: Renda R\$		
8. Informante: Escolaridade		
Fornecimento de Informações		
9. Paciente: () 1. Informa tudo. () 2. Informa parcialmente. () 3. Não informa.		
10. Acompanhante (<i>grau de relação, p.ex: mãe</i>):..... () 1. Informa tudo. () 2. Informa parcialmente. () 3. Não informa.		
Caracterização		
11. Tomografia- Lado do AVE: 1. () direito 2.() esquerdo		
12. Tempo do AVC 1. () > 6m -12 m 2. () >12-24m 3. () >24m		
13. Faz uso de alguma medicação? 1. () Não 2. () Sim. Quais? _____		
14. Faz fisioterapia? 1.() Não 2. () Sim		
15. Fez Fisioterapia? 1.() Não 2. () Sim		
16. Pressão arterial 1. () <130x85 normal 2. () >130x85-139x89 limítrofe 3. () >140x90 -160x 100 H.L 4. () >160x100-180x110 moderada 5() >180x110 grave		
17. Frequência Cardíaca em Repouso 1. () < 100bpm 2. () >100bpm		
18. Peso: _____Kg		
19. Altura: _____m		
20 IMC: _____		
Fatores de Risco		
21 . Etnia/Raça () 1. Branco () 2.Pardo () 3. Preto () 4.	22. História familiar de AVC/ATI 1.() Sim 2.() Não	23. Doenças cardíacas () 1. Sim () 2. Não
24. Diabete Mellitus 1. () Sim 2. () Não	25. Consumo excessivo de álcool () 1. Sim () 2. Não	26. Hipertensão () 1. Sim () 2. Não
27. Fumo 1.() Sim 2 () Não	28. Obesidade 1.() Sim 2.() Não	29. Sedentarismo pré AVE 1.() Sim 2.() Não
30. sedentarismo pós AVE 1.() Sim 2.() Não		

ANEXO II

Escala de Equilíbrio de Berg

Tabela 1. Escala de equilíbrio de Berg^(3,6)

1) Posição sentada para posição em pé Instrução: Por favor, levante-se. Tente não usar suas mãos para se apoiar.	(4) capaz de levantar-se sem utilizar as mãos e estabilizar-se independentemente (3) capaz de levantar-se independentemente utilizando as mãos (2) capaz de levantar-se utilizando as mãos após diversas tentativas (1) necessita de ajuda mínima para levantar-se ou estabilizar-se (0) necessita de ajuda moderada ou máxima para levantar-se
2) Permanecer em pé sem apoio Instrução: Por favor, fique em pé por 2 minutos sem se apoiar. Se o paciente for capaz de permanecer em pé por 2 minutos sem apoio, dê o número total de pontos o item N° 3. Continue com o item N°4.	(4) capaz de permanecer em pé com segurança por 2 minutos (3) capaz de permanecer em pé por 2 minutos com supervisão (2) capaz de permanecer em pé por 30 segundos sem apoio (1) necessita de várias tentativas para permanecer em pé por 30 segundos sem apoio (0) incapaz de permanecer em pé por 30 segundos sem apoio
3) Permanecer sentado sem apoio nas costas, mas com os pés apoiados no chão ou num banquinho Instrução: Por favor, fique sentado sem apoiar as costas com os braços cruzados por 2 minutos.	(4) capaz de permanecer sentado com segurança e com firmeza por 2 minutos (3) capaz de permanecer sentado por 2 minutos sob supervisão (2) capaz de permanecer sentado por 30 segundos (1) capaz de permanecer sentado por 10 segundos (0) incapaz de permanecer sentado sem apoio durante 10 segundos
4) Posição em pé para posição sentada Instrução: Por favor, sente-se.	(4) senta-se com segurança com uso mínimo das mãos (3) controla a descida utilizando as mãos (2) utiliza a parte posterior das pernas contra a cadeira para controlar a descida (1) senta-se independentemente, mas tem descida sem controle (0) necessita de ajuda para sentar-se
5) Transferências Instrução: Arrume as cadeiras perpendicularmente ou uma de frente para a outra para uma transferência em pivô. Peça ao paciente para transferir-se de uma cadeira com apoio de braço para uma cadeira sem apoio de braço, e vice-versa.	(4) capaz de transferir-se com segurança com uso mínimo das mãos (3) capaz de transferir-se com segurança com o uso das mãos (2) capaz de transferir-se seguindo orientações verbais e/ou supervisão (1) necessita de uma pessoa para ajudar (0) necessita de duas pessoas para ajudar ou supervisionar para realizar a tarefa com segurança
6) Permanecer em pé sem apoio com os olhos fechados Instrução: Por favor, fique em pé e feche os olhos por 10 segundos.	(4) capaz de permanecer em pé por 10 segundos com segurança (3) capaz de permanecer em pé por 10 segundos com supervisão (2) capaz de permanecer em pé por 3 segundos (1) incapaz de permanecer com os olhos fechados durante 3 segundos, mas mantém-se em pé (0) necessita de ajuda para não cair
7) Permanecer em pé sem apoio com os pés juntos Instrução: Junte seus pés e fique em pé sem se apoiar.	(4) capaz de posicionar os pés juntos independentemente e permanecer por 1 minuto com segurança (3) capaz de posicionar os pés juntos independentemente e permanecer por 1 minuto com supervisão (2) capaz de posicionar os pés juntos independentemente e permanecer por 30 segundos (1) necessita de ajuda para posicionar-se, mas é capaz de permanecer com os pés juntos durante 15 segundos (0) necessita de ajuda para posicionar-se e é incapaz de permanecer nessa posição por 15 segundos
8) Alcançar a frente com o braço estendido permanecendo em pé Instrução: Levante o braço a 90°. Estique os dedos e tente alcançar a frente o mais longe possível.	(4) pode avançar a frente >25 cm com segurança (3) pode avançar a frente >12,5 cm com segurança (2) pode avançar a frente >5 cm com segurança (1) pode avançar a frente, mas necessita de supervisão (0) perde o equilíbrio na tentativa, ou necessita de apoio externo
10) Virar-se e olhar para trás por cima dos ombros direito e esquerdo enquanto permanece em pé Instrução: Vire-se para olhar diretamente atrás de você por cima do seu ombro esquerdo sem tirar os pés do chão. Faça o mesmo por cima do ombro direito.	(4) olha para trás de ambos os lados com uma boa distribuição do peso (3) olha para trás somente de um lado, o lado contrário demonstra menor distribuição do peso (2) vira somente para os lados, mas mantém o equilíbrio (1) necessita de supervisão para virar (0) necessita de ajuda para não perder o equilíbrio ou cair
11) Girar 360 graus Instrução: Gire-se completamente ao redor de si mesmo. Pausa. Gire-se completamente ao redor de si mesmo em sentido contrário.	(4) capaz de girar 360 graus com segurança em 4 segundos ou menos (3) capaz de girar 360 graus com segurança somente para um lado em 4 segundos ou menos (2) capaz de girar 360 graus com segurança, mas lentamente (1) necessita de supervisão próxima ou orientações verbais (0) necessita de ajuda enquanto gira
12) Posicionar os pés alternadamente no degrau ou banquinho enquanto permanece em pé sem apoio Instrução: Toque cada pé alternadamente no degrau/banquinho. Continue até que cada pé tenha tocado o degrau/banquinho quatro vezes.	(4) capaz de permanecer em pé independentemente e com segurança, completando 8 movimentos em 20 segundos (3) capaz de permanecer em pé independentemente e completar 8 movimentos em >20 segundos (2) capaz de completar 4 movimentos sem ajuda (1) capaz de completar >2 movimentos com o mínimo de ajuda (0) incapaz de tentar, ou necessita de ajuda para não cair
13) Permanecer em pé sem apoio com um pé à frente Instrução: Coloque um pé diretamente à frente do outro na mesma linha, se você achar que não irá conseguir, coloque o pé um pouco mais à frente do outro pé e levemente para o lado.	(4) capaz de colocar um pé imediatamente à frente do outro, independentemente, e permanecer por 30 segundos (3) capaz de colocar um pé um pouco mais à frente do outro e levemente para o lado, independentemente, e permanecer por 30 segundos (2) capaz de dar um pequeno passo, independentemente, e permanecer por 30 segundos (1) necessita de ajuda para dar o passo, porém permanece por 15 segundos (0) perde o equilíbrio ao tentar dar um passo ou ficar de pé
14) Permanecer em pé sobre uma perna Instrução: Fique em pé sobre uma perna o máximo que você puder sem se segurar.	(4) capaz de levantar uma perna independentemente e permanecer por >10 segundos (3) capaz de levantar uma perna independentemente e permanecer por 5-10 segundos (2) capaz de levantar uma perna independentemente e permanecer por ≥ 3 segundos (1) tenta levantar uma perna, mas é incapaz de permanecer por 3 segundos, embora permaneça em pé independentemente (0) incapaz de tentar, ou necessita de ajuda para não cair

ANEXO III

Teste STF

1- Levantar e sentar na cadeira em 30 s.

Paciente sentado em uma cadeira sem encostos com os braços cruzados à frente deve levantar e sentar quantas vezes conseguir em 30s.

Uma prática antes do teste, no mesmo dia.

2 – Arm curl (Flexão de cotovelo).

Paciente sentado na cadeira sem encostos segurando um peso livre na mão do braço dominante. Realizar o máximo de flexões em 30s.

Utilizar membro superior esquerdo e membro superior direito.

Pesos:

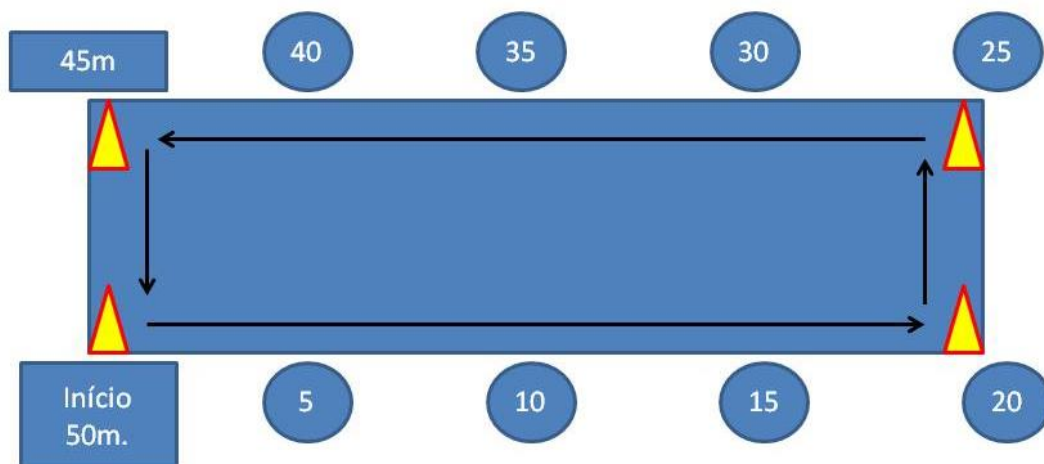
Homens = 4Kg

Mulheres = 2Kg

Uma prática antes do teste, no mesmo dia.

3 – 6-minute walk (caminhada de 6 minutos)

Paciente vai caminhar a maior distância possível em 6 minutos em uma área quadrada de 50m com divisões de 5m em 5m.



4 – Chair sit-and-reach (Sentar na cadeira e alcançar o pé).

Paciente sentado em cadeira, sem encostos e escorada na parede.

Estender uma perna à frente e em seguida tentar tocar os dedos do pé sem flexionar o joelho.

Investigador mede o que faltar para alcançar os dedos do pé como medida negativa e o que passar dos dedos como medida positiva.

5 – Back scratch (Coçar as costas).

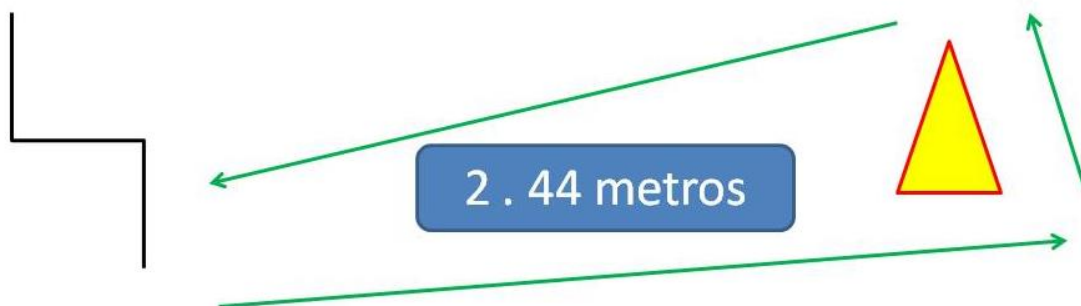
Paciente tentará encostar uma mão na outra por trás das costas, vindo uma por baixo e outra por cima.

Investigador mede negativamente o que faltar para encostar as mãos e positivamente o que passar do encontro dos dedos.

Praticar duas vezes antes, no mesmo dia. Depois realizar duas vezes o teste ficar com o melhor resultado.

6 – 8- Foot Up-and-Go. (Levantar e ir)

Paciente sentado na cadeira sem encostos escorada na parede. Ao sinal levanta e caminha o mais rápido possível até contornar um cone postado à sua frente e voltar a sentar na cadeira.



ANEXO IV

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do projeto: “O PAPEL DO POLIMORFISMO Mn-SOD Ala16Val NA FISIOPATOLOGIA DO ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO CRÔNICO: UM ESTUDO CLÍNICO”.

Pesquisadora responsável: Dra. Michele Rechia Fighera

Instituição/departamento: HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE SANTA MARIA/ CCS.

Telefone para contato: 55- 3220-8178 (ambulatório de Fisioterapia)

Local da coleta de dados: AMBULATÓRIO DE FISIOTERAPIA DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE SANTA MARIA.

1- O projeto de pesquisa será realizado no Ambulatório de Fisioterapia do Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM) e terá como objetivo investigar o envolvimento da via apoptótica e de dano ao DNA em pacientes após AVE.

2- Antes do início do tratamento será coletada amostra de sangue e aplicado um questionário clínico.

3- O sangue será coletado para análise bioquímica antes do início do protocolo de tratamento e após o seu término. A amostra de sangue será coletada por uma enfermeira e uma farmacêutica, alunas dos programas de pós-graduação de farmacologia e bioquímica da UFSM.

4- A amostra de sangue será realizada por punção periférica da veia do antebraço. A coleta de sangue, não causará risco para a sua saúde e bem-estar.

5- Participando do estudo você irá responder algumas perguntas sobre sua dor, suas atividades diárias, dados pessoais e médicos.

6- Você não terá nenhum gasto participando do projeto e sua participação será por sua própria vontade.

7- Sua identidade e suas respostas serão mantidas em segredo (caráter anônimo dos prontuários) e somente os/as pesquisadores/as envolvidos terão acesso às informações. Entretanto, os dados coletados nesta pesquisa poderão ser publicados em revistas médicas e provavelmente apresentados em congresso. As informações contidas nas fichas serão guardadas e poderão ser usadas em outros estudos, sendo sempre seu nome mantido em sigilo.

8- Você tem o direito de fazer qualquer pergunta sobre o projeto aos/as pesquisadores/as. Você pode parar sua participação no estudo a qualquer momento se não estiver satisfeito com o tratamento proposto e procurar outros recursos médicos.

9- Nós achamos que os resultados deste projeto poderão ajudar na sua qualidade de vida e de muitos outros pacientes com quadro clínico semelhante ao seu.

10- Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo, o participante tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas e explicadas verbalmente para mim, descrevendo o estudo
Título do projeto: “O PAPEL DO POLIMORFISMO Mn-SOD Ala16Val NA FISIOPATOLOGIA DO ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO CRÔNICO: UM ESTUDO CLÍNICO”.

Eu discuti com a médica Michele Rechia Fighera, sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade (lido e anexado por escrito 'a este termo de consentimento que irei assinar) e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do/a Participante

N. identidade(CI)

Assinatura do responsável pelo estudo

Data: ___/___/___

Endereço para contato: Ambulatório de fisioterapia - Hospital Universitário de Santa Maria, HUSM. Faixa de Camobi, Km 9 – Campus Universitário. CEP: 97105-900 Santa Maria/RS – Brasil.
Telefone: **55- 3220-8178**

ANEXO V**TERMO DE CONFIDENCIALIDADE**

Título do projeto: “O PAPEL DO POLIMORFISMO Mn-SOD Ala16Val NA FISIOPATOLOGIA DO ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO CRÔNICO: UM ESTUDO CLÍNICO”.

Pesquisador responsável: Michele Rechia Fighera

Instituição/Departamento: UFSM / Departamento de Neuropsiquiatria

Telefone para contato: 55- 3220-8178 (ambulatório de Fisioterapia)

Local da coleta de dados: *AMBULATÓRIO DE FISIOTERAPIA DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE SANTA MARIA*

Os pesquisadores do presente projeto se comprometem a preservar a privacidade dos pacientes cujos dados serão coletados através da ficha de avaliação no Ambulatório de Fisioterapia. Concordam, igualmente, que estas informações serão utilizadas única e exclusivamente para execução do presente projeto. As informações somente poderão ser divulgadas de forma anônima e serão mantidas na sala do departamento de Neuropsiquiatria (sala número 1446/ prédio do Centro de Ciências da Saúde por um período de 4 anos sob a responsabilidade do Prof.(a) Pesquisadora Michele Rechia Fighera. Após este período, os dados serão destruídos. Este projeto de pesquisa foi revisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFSM em/...../....., com o número do CAAE

Santa Maria,.....dede 20.....

.....
Assinatura do pesquisador responsável