

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**ASSOCIAÇÃO DA VIA INFLAMATÓRIA E APOPTÓTICA NA  
PATOLOGIA DO ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO  
TARDIO: RELAÇÃO COM A DISLIPIDEMIA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Eduardo Tanuri Pascotini**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2015**

**ASSOCIAÇÃO DA VIA INFLAMATÓRIA E APOPTÓTICA NA  
PATOLOGIA DO ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO  
TARDIO: RELAÇÃO COM A DISLIPIDEMIA**

**Por**

**Eduardo Tanuri Pascotini**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da  
Universidade Federal de Santa Maria (UFSM,RS) como requisito para obtenção do  
grau de Mestre em Farmacologia

**Orientadora: Prof. Dr. Michele Rechia Figuera  
Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Freire Royes**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2015**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

A comissão examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**ASSOCIAÇÃO DA VIA INFLAMATÓRIA E APOPTÓTICA NA  
PATOLOGIA DO ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO  
TARDIO: RELAÇÃO COM A DISLIPIDEMIA**

elaborada por

**Eduardo Tanuri Pascotini**

Como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Farmacologia

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

**Profa. Dra. Michele Rechia Figuera  
(Orientadora)**

---

**Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos**

---

**Prof. Dr. Felipe de Souza Stigger**

**Santa Maria, RS, Brasil, 2015**

***Dedico este trabalho à minha família!***

***“É na educação dos filhos que se revelam as virtudes dos pais”.***

***(Coelho Neto)***

## **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. À minha namorada, Maira, fiel companheira em todos os momentos, inclusive com auxílio técnico na formulação deste trabalho.

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, 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 à professora Ivana.

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

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil.

### **Associação da via inflamatória e apoptótica na patofisiologia do acidente vascular encefálico tardio: relação com a dislipidemia**

Autor: Eduardo Tanuri Pascotini

Orientadora: Michele Rechia Fighera

Co-orientador: Luiz Fernando Freire Royes

Local e data de defesa: Santa Maria, 09 de Fevereiro de 2014

O Acidente Vascular Encefálico (AVE) é caracterizado pela perda rápida da função neurológica por uma isquemia ou hemorragia cerebral. No AVE isquêmico, o estresse oxidativo e a neuroinflamação contribuem para a patofisiologia do dano cerebral, conduzindo a apoptose e morte celular. A dislipidemia é considerada um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento do AVE, induzindo a aterogênese e inflamação, aumentando as chances de novos eventos vasculares agudos. Entretanto, são escassos os estudos sobre estes eventos na fase tardia (>6 meses) do AVE e se a dislipidemia pode contribuir para a patofisiologia nesta fase da doença. O presente estudo teve como objetivo investigar se existe uma associação entre a via inflamatória e apoptótica, bem como, um envolvimento do dano oxidativo e da dislipidemia nas amostras sanguíneas de pacientes com AVE na fase tardia. Este foi um estudo caso-controle, onde 40 pacientes que sofreram AVE (Grupo AVE) e 40 sujeitos saudáveis (Grupo Controle) foram recrutados a realizar uma coleta de sangue e preenchimento de um questionário clínico. Foram mensurados os seguintes marcadores: Diclorodihidrofluoroscéina (DCF), Nitrito/Nitrato ( $\text{NO}_x$ ), Fator de necrose tumoral alfa ( $\text{TNF-}\alpha$ ), Acetilcolinterterase (AChE), Caspase 8 (CASP 8), Caspase 3 (CASP 3) e Picogreen (PG), em amostras sanguíneas da circulação periférica. Além disso, foram realizadas correlações entre DCF,  $\text{NO}_x$ ,  $\text{TNF-}\alpha$ , AChE, CASP 8, CASP 3 e PG com os grupos do estudo. Os níveis dos marcadores também foram comparados com indicadores de perfil lipídico como: triglicerídeos (TG), colesterol total (CT), LDL e HDL e o perfil medicamentoso. As análises estatísticas mostraram que os pacientes pós-AVE apresentaram níveis aumentados de DCF ( $p < 0,0001$ ),  $\text{NO}_x$  ( $p < 0,0001$ ),  $\text{TNF-}\alpha$  ( $p < 0,0001$ ) e AChE ( $p < 0,0001$ ), assim como, CASP 8 ( $p < 0,0001$ ), CASP 3 ( $p < 0,0001$ ) e PG ( $p < 0,0001$ ) quando comparados ao controle. Uma correlação positiva foi observada entre os níveis de  $\text{TNF-}\alpha$  com a CASP 8 ( $r = 0,4$ ;  $p < 0,05$ ) e CASP 3 ( $r = 0,4$ ;  $p < 0,05$ ), porém quando comparado aos níveis oxidativos/nitrosativos não houve correlação. Além disso, o estudo mostrou que os pacientes pós-AVE dislipidêmicos ( $\text{AVE}_d$ ) apresentaram níveis significativamente elevados de  $\text{TNF-}\alpha$ , CASP 8 e CASP 3, quando comparados com os pacientes pós-AVE sem dislipidemia ( $\text{AVE}_{nd}$ ) e com o grupo controle. Desta forma, os resultados sugerem que os marcadores oxidativos e inflamatórios podem estar aumentados mesmo na fase crônica do AVE, e culminarem na ativação das caspases (apoptose) e consequente dano ao DNA. Assim, é plausível propor que a dislipidemia na fase tardia do AVE pode contribuir para a piora do quadro inflamatório e aumentar o risco de novos eventos neurovasculares.

**Palavras-Chave:** Acidente Vascular Encefálico, Estresse Oxidativo, Inflamação, Caspases, Dano ao DNA e Dislipidemia.

## ABSTRACT

Master Dissertation

Graduating Program in Pharmacology

Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

### **Inflammatory and apoptotic pathways association in a later phase of stroke pathophysiology: relation to dyslipidemia**

Author: Eduardo Tanuri Pascotini

Advisor: Michele Rechia Figuera

Co-advisor: Luiz Fernando Freire Royes

Date and place of defense: Santa Maria, February 9<sup>th</sup>, 2014

Stroke occurs when blood flow to the brain is interrupted by an embolic or thrombotic occlusion of a cerebral artery (ischemic stroke) or by bleeding from a ruptured blood vessel (hemorrhagic stroke). Oxidative stress and brain inflammation are thought to contribute to the pathophysiology of cerebral injury in acute stroke, leading to apoptosis and cell death. Lipid accumulation may lead to progression of carotid plaques and inflammation, contributing to increased acute stroke risk. However, little is known about these events and markers in the late stroke (> 6 months) and if dyslipidemia could contribute to disease pathophysiology in a later phase. In this case-control study, we recruited stroke patients (n=40) and health subjects (control group; n=40). Dichlorodihydrofluorescein (DCFH), nitrite/nitrate (NO<sub>x</sub>), Tumor necrosis factor – alpha (TNF-α), Acetylcholinesterase (AChE), Caspase 8 (CASP 8), Caspase 3 (CASP 3) and Picogreen (PG) were measured in periphery blood samples. Furthermore, a correlation among all measured markers (DCFH, NO<sub>x</sub>, TNF-α, AChE, CASP 8, CASP 3 and PG) was realized. The markers levels were also compared to triglycerides (TG), total (CHO), LDL and HDL cholesterol levels and medications used. Statistical analyses showed that stroke patients presented an increase of DCFH, NO<sub>x</sub>, TNF-α and AChE levels when compared to control subjects. In addition, we observed that stroke patients had significantly higher CASP 8, CASP 3 and PG levels than control group. A significant correlation between TNF-α with CASP 8 (r = 0.4) and CASP 3 (r = 0.4) levels was observed, but not with oxidative/nitrosative markers. Moreover, we observed that stroke patients with dyslipidemia had significantly higher TNF-α, CASP 8 and CASP 3 levels than stroke without dyslipidemia and control groups. Our findings suggest that oxidative and inflammatory markers may be still increased and lead to caspases activation and DNA damage even after 6 months to cerebral injury. Furthermore, it is plausible to propose that dyslipidemia may contribute to worsen proinflammatory state in a later phase of stroke and an increased risk to new neurovascular events.

**Keywords:** Stroke, Oxidative Stress, Inflammation, Caspases, DNA damage, Dyslipidemia.



## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Tabela 1.....	14
Figura 1.....	13
Figura 2.....	17
Figura 3.....	18
Figura 4.....	22
Figura 5.....	25
Figura 6.....	61
Figura 7.....	74
Figura 8.....	75
Figura 9.....	76
Figura 10.....	77

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
Apaf-1	Fator-1 de ativação de protease apoptótica
ATP	Adenosina Trifosfato
AVDs	Atividades de vida diárias
AVE	Acidente Vascular Encefálico
AVE <sub>i</sub>	Acidente Vascular Encefálico Isquêmico
AVE <sub>h</sub>	Acidente Vascular Encefálico Hemorrágico
AVE <sub>d</sub>	Grupo AVE dislipidêmico
AVE <sub>nd</sub>	Grupo AVE não dislipidêmico
BChE	Butirilcolinesterase
CAD	DNase ativada por caspases
CAT	Catalase
CASP 8	Caspase 8
CASP 3	Caspase 3
CT	Colesterol total
DCF	Diclorofluorosceína
DCFH	Diclodihidrofluorosceína
DCFDA	Diacetato de Diclorofluorosceína
ERs	Espécies reativas
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
GP <sub>x</sub>	Glutathiona peroxidase
GSH	Glutathiona redutase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
HBA1C	Hemoglobina glicada 1 <sup>a</sup>
IAP	Proteína inibidora de apoptose
IMC	Índice de massa corporal
IL-1 $\beta$	Interleucina 1-Beta
LDLox	LDL oxidado
MnSOD	Superóxido dismutase manganês
NMDA	N-metil-D-aspartato

NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NOx	Nitrito/nitrato
n/eNOS	Óxido nítrico sintase neuronal e endotelial
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Ânion superóxido
ONOO <sup>-</sup>	Peroxinitrito
OH <sup>-</sup>	Radical hidroxil
PARP	Poly ADP-ribose polimerase
PG	Picogreen
RLs	Radicais livres
r-tPA	Ativador do plasminogênio tecidual recombinante
SOD	Superóxido dismutase
Smac	Ativador secundário de caspases derivado da mitocôndria
TG	Triglicerídeos
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa

## Sumário

<b>LISTA DE FIGURAS E TABELAS</b> .....	8
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	9
<b>APRESENTAÇÃO</b> .....	12
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	13
1.1 Acidente Vascular Encefálico .....	13
1.2 Patofisiologia .....	14
1.3 Biomarcadores de estresse oxidativo e inflamação .....	20
1.4 Biomarcadores apoptóticos e de dano ao DNA .....	24
1.5 Tratamento .....	26
1.6 Objetivos.....	27
1.6.1 Objetivo Geral .....	27
1.6.2 Objetivos Específicos.....	27
<b>2. ARTIGO CIENTIFICO</b> .....	31
2.1 Apoptotic markers and dna damage are related to late phase of stroke: involvement of dyslipidemia and inflammation.....	31
2.1.1 Título em português .....	31
2.1.2 Autores .....	31
<b>3. DISCUSSÃO</b> .....	57
<b>4. CONCLUSÃO</b> .....	61
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	62
<b>ANEXOS</b> .....	73

## APRESENTAÇÃO

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

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão sob a forma de artigo, o qual se encontra no item **ARTIGO CIENTÍFICO**. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas encontram-se no próprio artigo e representam a íntegra deste trabalho.

Os itens **DISCUSSÃO** e **CONCLUSÃO** da dissertação apresentam interpretações e comentários gerais sobre o artigo científico contidos no final neste trabalho.

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

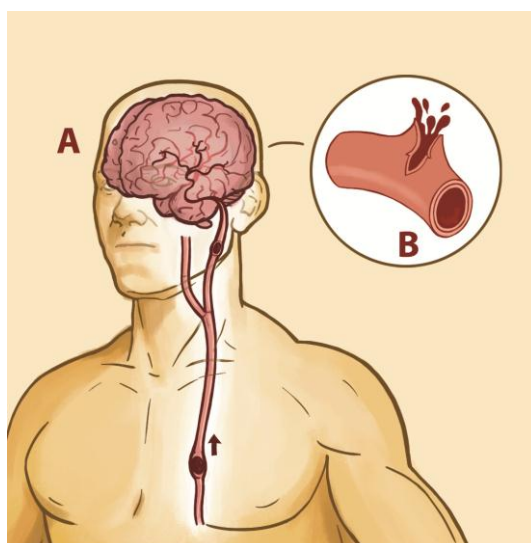
O item **ANEXOS** refere-se ao questionário clínico utilizado neste estudo, assim como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e o Termo de Confidencialidade.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Acidente Vascular Encefálico

O AVE é, segundo a Organização Mundial da Saúde (2010), a segunda 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 de adultos. Além disso, entre aqueles pacientes que sobrevivem, a maioria necessita de reabilitação para as sequelas motoras consequentes da patologia, sendo que 70% não retornam ao seu trabalho e 30% necessitam de auxílio para caminhar e realizar atividades de vida diárias (AVDs) (BELDA-LOUIS et al., 2011).

O AVE é caracterizado por uma afecção súbita que afeta a circulação sanguínea para o cérebro por bloqueios vasculares (NORRVING e KISSELA, 2013). Esta condição geralmente envolve uma imediata privação tanto de glicose quanto de oxigênio, os quais são necessários para manutenção das demandas metabólicas do cérebro (AHMAD e GRAHAM, 2010). Estes bloqueios podem ser por oclusão embólica ou trombótica da artéria cerebral, o que caracteriza o AVE isquêmico (AVEi), ou pode ser por um extravasamento de sangue através de um vaso sanguíneo rompido, sendo este o AVE hemorrágico (AVEh) (WOODRUFF et al., 2011). (Figura 1).



**Figura 1- AVE Isquêmico e Hemorrágico.** Desenho ilustrativo mostrando 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 e os não modificáveis, 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 (GOLDSTEIN et al., 2011).

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

Tabela 1: Principais fatores associados para o AVE; AIT (Acidente isquêmico transitório).

Entre as principais sequelas motoras pós-AVE relacionadas na literatura estão a diminuição da força muscular, perda do controle muscular volitivo, incoordenação motora e hipertonia espástica (FRANCISCO et al., 2006). Em função destas sequelas motoras, os indivíduos acabam desenvolvendo a 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; MARTIN, et al., 2004; NUNES e QUEVEDO, 2004).

## **1.2 Patofisiologia**

No AVEi, há a formação de duas regiões dentro do território isquêmico, um território nuclear central, envolto por um território de penumbra isquêmica (KUMAR et al., 2010). Nestes casos, o fluido sanguíneo cerebral reduzido para menos de 10mL/100g/min, resulta no território isquêmico central (BISDAS et al., 2004), o qual culmina, rapidamente, em morte celular necrótica irreversível (METHA et al., 2007). Caso a circulação sanguínea cerebral se mantenha entre 10 e 50 mL/100g/min (sendo que este segundo significa valores fisiologicamente normais), uma penumbra

isquêmica pode ser formada entre o território isquêmico central e o tecido normal, saudável (HOSSMAN, 1994).

Esta região de penumbra, por ainda haver disponibilidade de glicose e oxigênio dos vasos sanguíneos colaterais, geralmente resulta em um diferente tipo de morte celular, dependente de pouca energia, a apoptose (BROUGHTON et al., 2009). Caso os níveis de perfusão não se estabeleçam em tempo suficiente a região de penumbra acaba por ser tornar uma região isquêmica central, sem recuperação, a região de penumbra é atualmente considerada a de maior relevância como alvo de terapias pós-AVE (WEINSTEIN et al., 2004).

Entre os fatores de risco para o desenvolvimento da doença, a dislipidemia tem aparecido sistematicamente nos últimos anos como alvo de estudos e pesquisas. Tratam-se de alterações metabólicas lipídicas decorrentes de distúrbios em qualquer fase do metabolismo lipídico, que ocasionam repercussão nos níveis séricos das lipoproteínas (JONES et al., 2009).

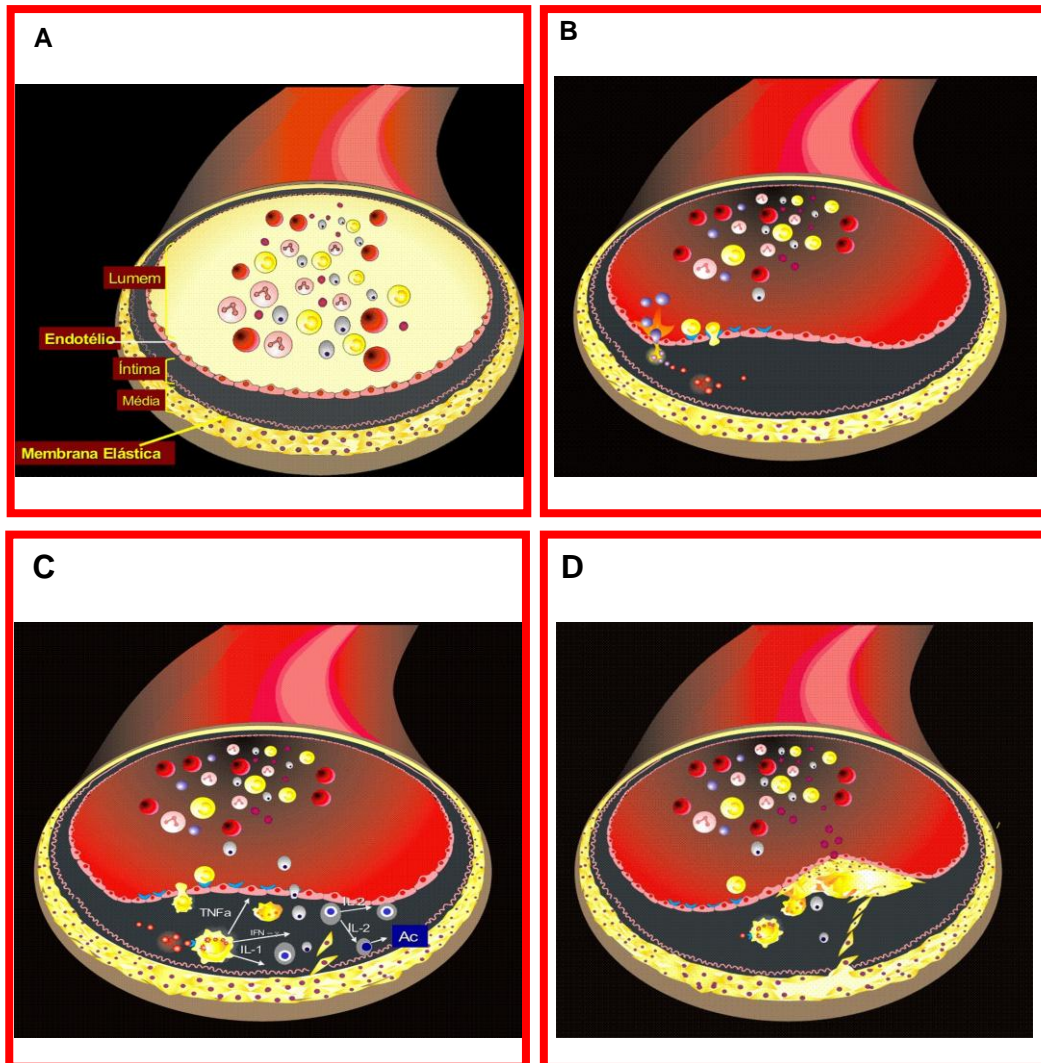
As dislipidemias são classificadas como laboratorial e etiológica. Na classificação laboratorial, pode-se afirmar como dislipidemia a hipercolesterolemia isolada, ou seja, o CT acima de 240 mg/dL e/ou do colesterol LDL para níveis maiores que 160 mg/dL, a hipertrigliceridemia isolada – aumento dos níveis de TG acima de 200 mg/dL, a hiperlipidemia mista – aumento dos níveis de CT associado ao aumento dos níveis de TG, a diminuição isolada do colesterol HDL abaixo de 40 mg/dL, ou, por fim, a associação de todos estes fatores. A classificação etiológica dispõe sobre as dislipidemias primárias que tem origem genética e as secundárias, que podem ser causadas por outras doenças ou utilização de medicamentos (XAVIER et al., 2013),

A hipercolesterolemia está associada a diversas disfunções endoteliais, sendo considerada como um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardio e neurovasculare, que, quando associada a fatores biológicos e/ou ambientais, leva à formação da placa ateromatosa aumentando os índices de morbidade ou mortalidade (LIBBY, 2002). A hipercolesterolemia provoca uma disfunção endotelial, a qual aumenta a permeabilidade da camada íntima a lipoproteínas plasmáticas favorecendo a retenção das mesmas no espaço subendotelial, e, a partir desta retenção, as partículas de LDL sofrem oxidação, formando o LDL oxidado (LDL<sub>ox</sub>) (SKILTON et al., 2007).



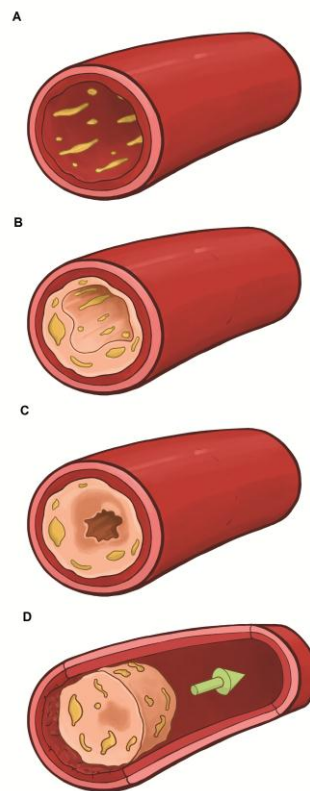
O LDL é oxidado pelos radicais livres (RL) produzidos pelos macrófagos, células endoteliais ou células musculares lisas (HARRISON et al., 2003, GAUTIER et al., 2009). A lipoperoxidação começa nos ácidos graxos poli-insaturados dos fosfolipídios, estendendo-se aos lipídios nucleares, como o colesterol livre e ésteres de colesterol (ALBERTINI et al., 2002). O LDL<sub>ox</sub> presente provoca o surgimento de moléculas de adesão leucocitária na superfície endotelial, e estas são responsáveis pela atração de monócitos e linfócitos para a parede arterial (LEVITAN et al., 2009). O LDL<sub>ox</sub> faz com que as células endoteliais expressem determinadas moléculas de adesão que permitem aos monócitos e linfócitos T a possibilidade de aderir-se às células endoteliais (SCALIA et al., 1998). Os monócitos migram para o espaço subendotelial onde se diferenciam em macrófagos, que por sua vez captam o LDL<sub>ox</sub> através de receptores específicos, e processam o auto-antígeno ativando os linfócitos T e promovendo a secreção de citocinas pró-inflamatórias como o interferon- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e interleucina-6, as quais podem aumentar as propriedades adesivas das células endoteliais (QIN et al., 2006; PERSSON et al., 2006; EMMANUEL et al., 2009).

Com a resposta inflamatória ativada, os linfócitos T ativados proliferam e também passam a secretar citocinas pró-inflamatórias, entre elas o TNF- $\alpha$ , que causam uma maior ativação de macrófagos, ativação vascular e inflamação, estimulam a proliferação das células musculares lisas e a síntese de colágeno, as quais se agregam as células espumosas, completando a formação da placa ateromatosa (CHAKARIDA et al., 2009; BERG et al., 2009). (Figura 2).



**Figura 2 – Formação da placa ateromatosa.** Estrutura normal da artéria (A), Oxidação do LDL (B), Formação das células espumosas e processo inflamatório (C), Formação da placa de ateroma (D). Adaptado de Duarte (2008).

Após a formação da placa, ainda pode ocorrer sua ruptura, levando à trombose ou embolia e consequente isquemia. Os locais onde mais frequentemente estas interrupções de fluxo sanguíneo acontecem são nas artérias coronárias, cerebrovasculares e periféricas (MUBITANO et al., 1997). (Figura 2, A-D).



**Figura 3** – Imagem ilustrativa mostrando a formação da placa aterosclerótica no vaso sanguíneo (A-C) e a ruptura e consequente deslocamento da placa, caracterizando o êmbolo (D). Criado por Matheus Tanuri Pascolini.

No AVEi, a lesão no tecido cerebral concomitante com a falha do processo celular desencadeia uma complexa cascata de mecanismos moleculares e celulares envolvidos na morte celular isquêmica por necrose e/ou apoptose, e em geral, é caracterizada pelos seguintes eventos: falha bioenergética, excitotoxicidade, estresse oxidativo e inflamação, (CECHETTI et al., 2012; SHICHITA et al., 2012), além da citotoxicidade mediada por citocinas, ativação de células gliais, ativação do complemento e de vias de morte celular (WOODRUFF et al., 2011).

O insulto inicial causado pela isquemia cerebral é 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  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, resultando na falha do controle do gradiente iônico das membranas, e,

conseqüentemente, aumentando o influxo de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  e  $\text{Ca}^{2+}$  para dentro das células (MORO et al., 2005).

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  $\text{Ca}^{2+}$ , induzindo a liberação descontrolada de glutamato na fenda sináptica. Além disso, a despolarização de neurônios adicionais, causando o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  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 e a inflamação têm um importante papel no AVEi (SAMSON et al., 2005; CHERUBINI et al., 2005), entretanto, a relação entre a inflamação e o estresse oxidativo ainda não está totalmente esclarecida (CHAMORRO, 2004). O estresse oxidativo pode ser definido como um desequilíbrio entre as defesas antioxidantes e agentes oxidantes, em favor ao segundo, sendo então potencialmente danoso (SIES, 1997). O aumento na produção do  $\text{O}_2^-$  pode levar a formação de ER adicionais, como o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), radical hidroxil ( $\text{OH}^-$ ) e peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) pela reação com óxido nítrico (NO) produzido pela óxido nítrico sintase neuronal e endotelial (n/eNOS) ativada por  $\text{Ca}^{2+}$  (HEEBA e EI-HANAFY, 2012).

O AVEi leva a produção tanto de espécies reativas de oxigênio (EROs) como espécies reativas de nitrogênio (ERNs) no tecido e no plasma através de diversos mecanismos (GUZIK et al., 2003), incluindo a estimulação de receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA) (CHERUBINI et al., 2005), disfunção mitocondrial (LAFONCAZAL et al., 1993), ativação da óxido nítrico sintase neuronal (NOS) (PIANTADOSI e ZHANG., 1996) e migração de neutrófilos e leucócitos, geradores de ânion superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) (LIPTON E ROSENBER, 1994).

Muitos estudos demonstram a participação da via inflamatória na patofisiologia do AVE (VILLA et al., 2000; CHAMORRO e HALLENBECK, 2006; PANDYA et al., 2011) e esta resposta inflamatória pode contribuir para o dano isquêmico cerebral (CHAMORRO e HALLENBECK, 2006). Quando há um dano

encefálico, 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 a Interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e o TNF- $\alpha$ , o que aumenta o dano tecidual (BANATI et al., 1993; ROTHWELL et al., 1997).

Após a ligação do TNF- $\alpha$ , seus receptores podem ser interligados levando a ativação das caspases executoras, como a CASP 8, por meio da via apoptótica extrínseca (SCHNEIDER-BRACHERT et al., 2004). A CASP 8 combinada com sua capacidade de induzir a apoptose por meio da via extrínseca, também desencadeia a via apoptótica intrínseca, por meio da clivagem dos membros da família dos fatores pró-apoptóticos Bcl-2 para iniciar o processo apoptótico induzido pela mitocôndria (GROSS et al., 1999;). Estes eventos podem induzir a um aumento subsequente de espécies reativas (ER), levando a ativação da CASP 3 e ao dano celular (GRAHAM, 2001; SUGAWARA, 2004).

### **1.3 Biomarcadores de estresse oxidativo e inflamação**

Diversos estudos já demonstraram a importância das EROs e ERNs na patofisiologia de diversas desordens neurológicas (CHAN, 2001; BENEDICTO et al., 2008; NAI-WEN et al., 2014). Estas ERs não têm, necessariamente, um desemparelhamento 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).

Durante sua existência, 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<sub>2</sub><sup>-</sup>, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e a mais reativa de todos, o OH<sup>-</sup>. O O<sub>2</sub><sup>-</sup> 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<sub>2</sub><sup>-</sup>, sendo que este pode reagir com o NO e produzir o ONOO<sup>-</sup>, este um radical fortemente reativo que causa disfunção proteica (BECKMAN

et al., 1990). O  $\text{OH}^-$  é produzido através do  $\text{H}_2\text{O}_2$  por uma reação envolvendo o cobre ( $\text{Cu}^{+1}$ ) ou ferro ( $\text{Fe}^{+2}$ ) no processo conhecido como reação de Fenton, assim como, a partir da união de  $\text{O}_2^-$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  na reação de Haber-Weiss, ou ainda, a partir do  $\text{ONOO}^-$  (BECKMAN et al., 1990; CHAN, 1996).

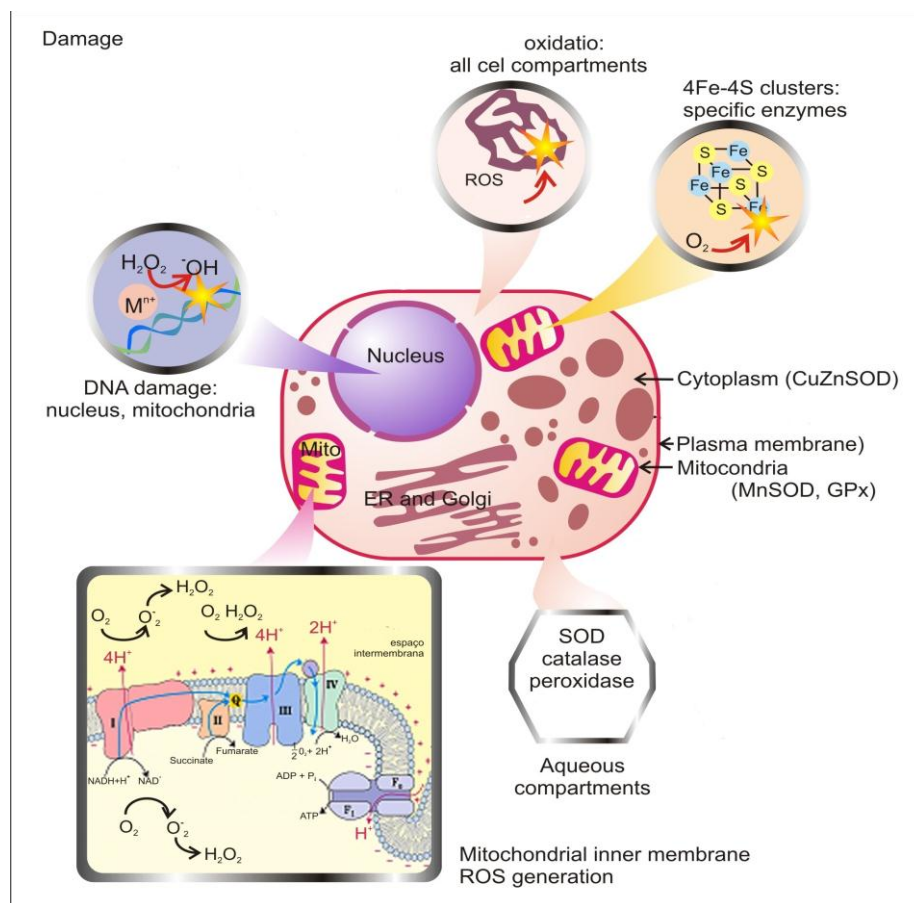
Níveis fisiológicos de ER podem ser eliminados por um sistema antioxidante enzimático e não-enzimático eficiente (NAVARRO e BOVERIS, 2008), assim como, um aumento na produção das ER, uma diminuição na eficiência destes sistemas antioxidantes, concomitantemente ou não, podem levar ao estresse oxidativo, que é caracterizado por uma oxidação de biomoléculas com consequente perda de suas funções biológicas (HALLIWELL e WHITEMAN, 2004). Entre as enzimas componentes do sistema de defesa antioxidante, a superóxido dismutase (SOD), a glutationala peroxidase (GPx), glutationala redutase (GSH) e a catalase (CAT) fazem parte das enzimáticas, assim como a glutationala reduzida, e vitaminas A, C, D e E são parte das não-enzimáticas (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999; CHAN, 2001).

É, exatamente, a enzima antioxidante SOD que degrada o  $\text{O}_2^-$  em  $\text{H}_2\text{O}_2$ , o qual será posteriormente convertido em água ( $\text{H}_2\text{O}$ ) por outra enzima deste sistema de defesa, a CAT ou GPx. Existem três classes da SOD dependendo de sua localização e metal componente: SOD1, SOD2 e SOD3. 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 cerebrospinal 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).

Um método para mensuração da produção de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , baseado na fluorescência, está sendo reaplicado para mensuração de EROs na mitocôndria. É baseado na fluorescência do diacetato de diclodihidrofluorosceína (DCFDA). O princípio do método baseia-se na detecção das EROs sendo proporcional a um aumento nos níveis basais, o que emite uma intensa fluorescência verde, somente

após a desacetilação e conseqüente oxidação, predominantemente, mas não exclusivamente, do  $\text{H}_2\text{O}_2$  (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  $\text{O}_2^-$ , 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,  $\text{NO}_x$ , são comumente utilizados para mediar a produção do NO (TATSCH, 2011).



**Figura 4 - Dano oxidativo nas macromoléculas biológicas e antioxidantes.** Formação do  $\text{OH}^\cdot$  a partir do  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Atividade da MnSOD e GPx à nível mitocondrial. Adaptado de Duarte (2008).

Outro fator relacionado ao dano cerebral, bastante evidenciado na literatura, é a resposta inflamatória, carregada por mediadores que são liberados ou ativados, entre eles, a IL-1 $\beta$ , a interleucina 6 e o TNF- $\alpha$ , assim como moléculas de adesão, estimulando a infiltração de leucócitos no parênquima encefálico (GERTZ et al., 2012).

Em resposta a quadros inflamatórios, infecciosos e outras mudanças ambientais, ocorre a liberação do TNF- $\alpha$ , 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- $\alpha$  medeia a ativação de diversos fatores de transcrição levando a um aumento na expressão gênica (HERBEIN e KHAN, 2008). A ligação do TNF- $\alpha$  aos seus receptores pode ativar diferentes vias sinalizadoras, entre elas, a via apoptótica (PARK e BOWERS, 2010). Sabe-se que o TNF- $\alpha$  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 como a IL-1 $\beta$ , a interleucina-6 e o TNF- $\alpha$ , sendo que as concentrações de TNF- $\alpha$  vem se mostrando bastantes elevados em pesquisas envolvendo indivíduos pós-AVE (FERRARESE et al., 1999; AL-BAHRANI et al., 2007), Da mesma forma tem sido proposto que o TNF- $\alpha$  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 imune, é expressa nos linfócitos T e promove a hidrólise da acetilcolina (ACh) para colina e acetato. Este neurotransmissor (ACh) 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 AChE, e também por outra enzima fortemente relacionada, a butirilcolinesterase



(BChE), ambas realizam a hidrólise e inativam a ACh, e são moduladas em danos inflamatórios (KAUFER et al., 1998).

As citocinas inflamatórias elevadas podem, por si só, causar danos neurológicos, e, conseqüentemente, as atividades séricas da AChE e da BChE podem refletir a intensidade da resposta neuroinflamatória em pacientes que sofreram AVE (ASSAYAG et al., 2010).

#### **1.4 Biomarcadores apoptóticos e de dano ao DNA.**

Como já citado, a morte celular pode ocorrer por necrose ou apoptose. A apoptose é um elemento ativo de morte celular que se difere da necrose por ser uma morte programada, por seus mecanismos regulatórios complexos e diferenças morfológicas. A importância da apoptose se dá por seu papel na manutenção da homeostase tecidual, e pelo fato de que um desbalanço em sua regulação pode ter resultados fatais. Pode estar envolvida em condições patológicas como oncogênese, doenças 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).

Uma classe de cisteínas proteases, as caspases, 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).

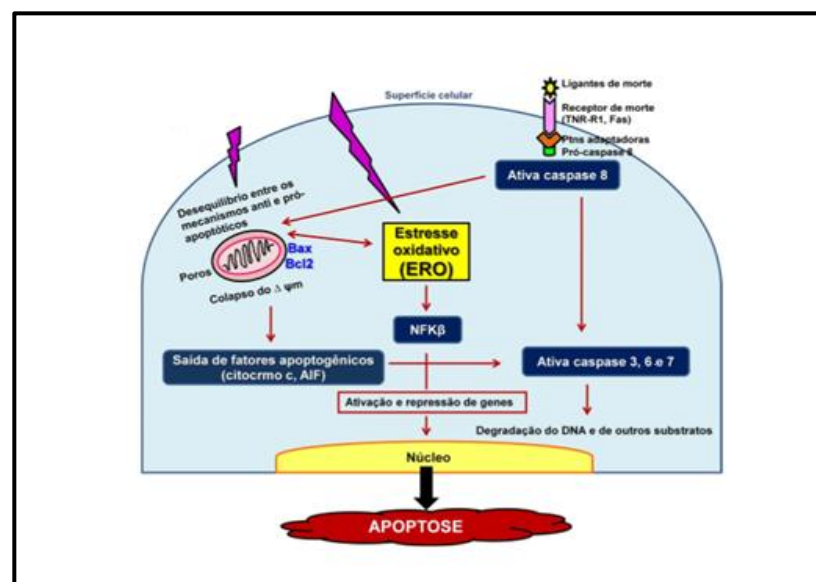
A partir da clivagem de uma classe de proteínas anti-apoptóticas, a rota mitocondrial é estimulada e a via intrínseca de apoptose é iniciada. Esta via inicia com o aumento da permeabilidade mitocondrial externa, o que leva ao extravasamento de determinadas proteínas mitocondriais, incluindo o citocromo c. A ativação conseqüente 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 programa após AVEi (ZHANG et al., 2004).

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 nucléicos 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 picogreen (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).



**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)

## 1.5 Tratamento

Atualmente, pode-se dividir as estratégias terapêuticas para o AVEi em duas categorias: recanalização vascular e neuroproteção. A recanalização do vaso sanguíneo pode ser realizada cirurgicamente ou mecanicamente, através da remoção do coágulo sanguíneo intravascular (SMITH et al., 2008), ou farmacologicamente, pela trombólise, utilizando um ativador do plasminogênio tecidual recombinante (r-tPA) (TASCNHER et al., 2011).

A reperfusão urgente, porém, segue sendo o primeiro alvo no tratamento do AVE, seja por terapia medicamentosa ou por intervenção endovascular. A restauração do fluxo sanguíneo para o tecido isquêmico tem se mostrado capaz de diminuir a mortalidade, assim como as consequências funcionais dos sobreviventes em três meses quando comparada com a ausência de revascularização (RHA e SAVER, 2007). O tratamento com r-tPA endovenoso é recomendado, somente, em uma janela terapêutica de 4,5 horas, onde os riscos de sangramento intracranial são maiores que os possíveis benefícios (LEES et al., 2010).

Outros medicamentos têm sido usados na terapêutica dos pacientes pós-AVE, como os anticoagulantes, antiplaquetários e hipolipimiantes (BECKER, 2007; SHAFI e LEVINE, 2010), além de agentes terapêuticos com propriedades antioxidantes (ebselen, carvedilol e bromocriptina; LIU et al., 1995, PANDYA et al., 2011), ação anti-inflamatória (melanocortinas, interferon- $\beta$  e 6-mercaptopurina; GIULIANI et al., 2007; CHANG et al., 2010) e medicamentos anti-excitotóxicos (felbamato, diazepam, nortriptilina; CORBETT et al., 2008; ZHANG et al., 2008).

Todos estas terapêuticas, entretanto, referem-se ao AVE agudo, e pouco se tem disponível para o tratamento de pacientes crônicos. Dentre eles é possível destacar os medicamentos anti-espasmódicos (baclofeno), a toxina botulínica e a fisioterapia. Esta última atua na recuperação neuronal, cognitiva, sensorial, físico-motora e, inclusive, psicológica do paciente que sofreu a doença (FRANCISCO et al., 2006; HORN et al., 2010; SCHIESS et al., 2010; LIEPERT, 2012; SOMMERFELD et al, 2012; VAN DE PORT e al., 2012).

Sabendo-se que, as caspases 8 e 3 são marcadores apoptóticos envolvidos no dano ao DNA e podem ser ativadas através da ligação do TNF- $\alpha$  a seus receptores, assim como o DCF é uma medida de dano oxidativo, torna-se importante a análise destes parâmetros para a compreensão da via apoptótica acidente

vascular encefálico. Dessa forma, esse estudo pode auxiliar na melhor compreensão da patologia e, portanto, fornecer conhecimento para desenvolver novos marcadores, assim como, novas medidas terapêuticas mais eficazes e seguras frente às co-morbidades consequentes a esta patologia.

## **1.6 Objetivos**

### **1.6.1 Objetivo Geral**

O presente estudo teve como objetivo investigar se existe uma associação entre a via inflamatória e apoptótica, bem como, um envolvimento do dano oxidativo e da dislipidemia nas amostras sanguíneas de pacientes com AVE tratados no Ambulatório de fisioterapia e de neurologia, pertencente ao Hospital Universitário (HUSM) comparando-os com indivíduos saudáveis.

### **1.6.2 Objetivos Específicos**

- Descrever as características da população em estudo em relação à idade, sexo, índice de massa corporal (IMC) e fatores associados ao AVE como hipertensão arterial, dislipidemia, tabagismo, sedentarismo e diabetes.
- Verificar as médias dos níveis séricos de glicose, hemoglobina glicada 1C (HBA1C), CT, LDL, HDL, TG, creatinina, ureia, TGO, TGP e fosfatase alcalina nos pacientes após AVE comparando com indivíduos saudáveis.
- Analisar a geração de ERs através dos níveis de DCF e NO<sub>x</sub> em leucócitos nos pacientes após AVE comparando com indivíduos saudáveis.
- Determinar os níveis séricos do TNF- $\alpha$  e AChE nos pacientes após AVE comparando com indivíduos saudáveis.
- Determinar a ativação das caspases 8 e 3 no soro dos pacientes após AVE comparando com indivíduos saudáveis.

- Investigar os possíveis danos ao DNA através do teste PG em leucócitos nos pacientes após AVE comparando com indivíduos saudáveis.

- Verificar se existe uma correlação dos níveis séricos de CT, LDL, HDL e TG dos pacientes com AVE com os parâmetros bioquímicos (DCFH, NO<sub>x</sub>, TNF- $\alpha$ , AChE, CASP 8, CASP 3 e PG) analisados no estudo.

- Verificar se existe uma correlação dos fármacos utilizados pelos pacientes com AVE com os parâmetros bioquímicos (DCFH, NO<sub>x</sub>, TNF- $\alpha$ , AChE, CASP 8, CASP 3 e PG) analisados no estudo.

Manuscrito

**Apoptotic Markers and DNA Damage are related to Late Phase of Stroke:  
Involvement of Dyslipidemia and Inflammation**

Eduardo Tanuri Pascotini<sup>a,d</sup>, Ariane Ethur Flores<sup>a,d</sup>, Aline Kegler<sup>a,b</sup>, Patricia Gabbi<sup>d</sup>,  
Guilherme Vargas Bochi<sup>d</sup>, Thais Doeler Algarve<sup>d</sup>, Ana Lucia Cervi Prado<sup>e</sup>, Marta M.  
M. F. Duarte<sup>d</sup>, Ivana B. M da Cruz<sup>d</sup>, Rafael Noal Moresco<sup>d</sup>, Luiz Fernando Freire  
Royes<sup>b,c,d</sup>, Michele Rechia Fighera<sup>a,b,c,d\*</sup>

Manuscrito Submetido para: Neuroscience

**Submissão:**

Journal: Neuroscience

Corresponding Author: Michele Fighera

Co-Authors: Eduardo T Pascotini; Ariane E Flores; Aline Kegler; Patricia Gabbi; Guilherme V Bochi; Thais D Algarve; Ana Lucia C Prado; Marta M Duarte; Ivana B Cruz; Rafael N Moresco; Luiz Fernando F Royes

Title: Apoptotic Markers and DNA Damage are related to Late Phase of Stroke: Involvement of Dyslipidemia and Inflammation

If you did not co-author this submission, please contact the Corresponding Author of this submission at [mrfighera@yahoo.com.br](mailto:mrfighera@yahoo.com.br); [mrfighera23@gmail.com](mailto:mrfighera23@gmail.com); do not follow the link below.

An Open Researcher and Contributor ID (ORCID) is a unique digital identifier to which you can link your published articles and other professional activities, providing a single record of all your research.

We would like to invite you to link your ORCID ID to this submission. If the submission is accepted, your ORCID ID will be linked to the final published article and transferred to CrossRef. Your ORCID account will also be updated.

To do this, visit our dedicated page in EES. There you can link to an existing ORCID ID or register for one and link the submission to it:

<http://ees.elsevier.com/nsc/l.asp?i=552131&l=HQP9G11P>

More information on ORCID can be found on the ORCID website, <http://www.ORCID.org>, or on our help page: [http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a\\_id/2210/p/7923](http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/2210/p/7923)

Like other Publishers, Elsevier supports ORCID - an open, non-profit, community based effort - and has adapted its submission system to enable authors and co-authors to connect their submissions to their unique ORCID IDs.

Thank you,

Neuroscience

## **2. ARTIGO CIENTIFICO**

### **2.1 Apoptotic Markers and DNA Damage are related to Late Phase of Stroke: Involvement of Dyslipidemia and Inflammation**

#### **2.1.1 Título em português**

Marcadores apoptóticos e de dano ao DNA estão relacionados ao acidente vascular encefálico crônico: Envolvimento da dislipidemia e da inflamação.

#### **2.1.2 Autores**

Eduardo Tanuri Pascotini<sup>a,d</sup>, Ariane Ethur Flores<sup>a,d</sup>, Aline Kegler<sup>a,b</sup>, Patricia Gabbi<sup>d</sup>, Guilherme Vargas Bochi<sup>d</sup>, Thais Doeler Algarve<sup>d</sup>, Ana Lucia Cervi Prado<sup>e</sup>, Marta M. M. F. Duarte<sup>d</sup>, Ivana B. M da Cruz<sup>d</sup>, Rafael Noal Moresco<sup>d</sup>, Luiz Fernando Freire Royes<sup>b,c,d</sup>, Michele Rechia Fighera<sup>a,b,c,d\*</sup>

<sup>a</sup>Centro de Ciências da Saúde  
Departamento de Neuropsiquiatria  
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

<sup>b</sup>Centro de Ciências Naturais e Exatas  
Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica  
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil.

<sup>c</sup>Centro de Educação Física e Desportos  
Laboratório de Bioquímica do Exercício (BIOEX)  
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil.

<sup>d</sup>Centro de Ciências da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia  
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil.

<sup>e</sup>Serviço de Fisioterapia  
Hospital Universitário de Santa Maria, RS, Brasil

Work supported by CNPq, CAPES and FAPERGS.

\*Corresponding author:  
Dra. Michele Rechia Fighera



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](mailto:mrfighera@yahoo.com.br)

### **Abbreviations**

AChE - Acetylcholinesterase  
CASP 8 - Caspase 8  
CASP 3 - Caspase 3  
DCF - Dichlorofluoroscein  
DCFH – Dichlodihidrorofluoroscin  
DCFDA - Dichlorofluoroscein diacetate  
FABP4 - Fatty acid binding proteins  
HbA1C – glycated hemoglobin 1AC  
IL-1 $\beta$  – Interleukin 1-beta  
MnSOD – manganese superoxide dismutase  
NO – Nitric Oxide  
NO<sub>x</sub> – nitrite/nitrate  
PG – Picogreen  
RS – Reactive Species  
solTNF – Soluble TNF  
<sub>d</sub>stroke – dyslipidemic stroke group  
<sub>nd</sub>stroke – non-dyslipidemic stroke group  
TG - Triglycerides  
TNF- $\alpha$  – Tumor necrosis fator-alpha  
Total CHO – Total Cholesterol

### **Abstract**

Oxidative stress and brain inflammation are thought to contribute to the pathophysiology of cerebral injury in acute stroke, leading to apoptosis and cell death. Lipid accumulation may lead to progression of carotid plaques and

inflammation, contributing to increased acute stroke risk. However, little is known about these events and markers in the late stroke (> 6 months) and if dyslipidemia could contribute to disease's pathophysiology in a later phase. In this case-control study, we recruited patients in the late stroke phase (n=40) and health subjects (control group; n=40). Dichlorodihydrofluorescein (DCFH), nitrite/nitrate (NO<sub>x</sub>), Tumor necrosis factor – alpha (TNF-α), Acetylcholinesterase (AChE), Caspase 8 (CASP 8), Caspase 3 (CASP 3) and Picogreen (PG) were measured in periphery blood samples. Furthermore, a correlation among all measured markers (DCFH, NO<sub>x</sub>, TNF-α, AChE, CASP 8, CASP 3 and PG) was realized. The markers levels were also compared to triglycerides (TG), total (CHO), LDL and HDL cholesterol levels and medications used. Statistical analyses showed that stroke patients presented an increase of DCFH, NO<sub>x</sub>, TNF-α and AChE levels when compared to control subjects. In addition, we observed that stroke patients had significantly higher CASP 8, CASP 3 and PG levels than control group. A significant correlation between TNF-α with CASP 8 (r = 0.4) and CASP 3 (r = 0.4) levels was observed, but not with oxidative/nitrosative markers. Moreover, we observed that stroke patients with dyslipidemia had significantly higher TNF-α, CASP 8 and CASP 3 levels than stroke without dyslipidemia and control groups. Our findings suggest that oxidative and inflammatory markers may be still increased and lead to caspases activation and DNA damage even after 6 months to cerebral injury. Furthermore, it is plausible to propose that dyslipidemia may contribute to worsen proinflammatory state in a later phase of stroke and an increased risk to new neurovascular events.

**Keywords:** Stroke, Oxidative Stress, Inflammation, Caspases, DNA damage, Dyslipidemia.

## INTRODUCTION

Ischemic stroke is an important disease with a high rate of morbidity and mortality (World Health Organization, 2010). It is the acute appearance of a disease that affects blood flow to the brain caused by vascular blockages (Norving and Kessela, 2013) and accounts for 85% of all strokes (Woodruff et al., 2011). Atherosclerosis is one of factors risk that may result in cerebral embolization and symptoms of cerebral ischemia leading to transient ischemic attack (TIA) or stroke (Holm et al., 2011). While the interaction between inflammation and lipid accumulation leads to progression of carotid plaques with the development of symptomatic lesions (Hansson, 2005; Halvorsen et al., 2008); the molecular mechanisms and the link among these events with stroke, manly in the late phase, are not fully understood.

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 (Cechetti et al., 2012; Shichita et al., 2012), beyond cytotoxicity mediated by cytokines, and cell death pathways activation (Goldstein et al, 2011). Reactive species (RS) are involved in several pathways related with the cell damage following stroke, such as apoptosis and inflammation (Chang et al., 2005; Yamamoto et al., 2008). In fact, when the brain is injured or affected by brain diseases (i.e. stroke), the microglia cells are rapidly activated (Nakajima and Kosaka, 2001), and this activation may lead to production of inflammatory cytokines, including interleukin-1 $\beta$  (IL- $\beta$ ) and TNF- $\alpha$  (Banati et al., 1993; Rothwell et al., 1997).

Recent studies also demonstrate a link between inflammatory pathways and cholinergic signaling, suggesting that AChE activity would reflect the intensity of the

neuroinflammatory response and predict 12-month mortality in stroke patients (Ben Assayag et al., 2010).

TNF- $\alpha$  is an immunomodulatory molecule known to be implicated in vascular and neurological diseases, such as atherosclerosis and stroke (Lambertsen et al., 2012; Mahalle et al., 2014). Immune responses within the CNS and systemic inflammatory events play important roles in the progression, repair and recovery of stroke, offering new immune-based approaches as future treatment strategies in the stroke (Lambertsen et al., 2012). In fact, elevation of soluble TNF (solTNF) may be a hallmark of acute and chronic neuroinflammation as well as a number of neurodegenerative conditions (McCoy and Tansey, 2008).

Other point of particular interest is the intermediary role of intracellular RS in signal transduction of TNF- $\alpha$  after ligation to its receptor. With the increasing understanding of the intracellular death circuitry initiated by TNF- $\alpha$  the exact role of RS in inflammatory signaling pathway is now believed to be far more complicated than originally thought. Recently, some important findings have highlighted the critical role of RS in TNF- $\alpha$  signaling, notably in TNF- $\alpha$  -mediated activation of cell death (apoptotic and necrotic) pathways (Graham, 2001; Schneder-Brachert et al., 2004; Sugawara, 2004). However, the role of inflammation, oxidative stress and apoptotic markers in the pathophysiology of late stroke as well as its relationship with dyslipidemia are not well elicited. Thus, this study aims to clarify the role these markers in late stroke (> 6 months) and if there is a link among these events with dyslipidemia.

## **EXPERIMENTAL PROCEDURES**

### **Study population**

Eighty subjects were selected and divided into two groups: control group (40 healthy subjects without diseases) and the stroke group (40 subjects post-stroke). All patients were evaluated using a questionnaire. Forty sex-matched healthy volunteers were included as normal controls. The study protocol was approved by the local institutional review boards at the authors' affiliated institutions. Informed consent was obtained from all the subjects or their legal surrogates (number 10555912.3.0000.5346).

### **Stroke group**

Among a total of 53 subjects with the disease, 40 were selected through the following exclusion criteria: Subjects with systolic/diastolic rest blood pressure major or equal that 180/100 mmHg, rest cardiac frequency major that 100 bpm and/or alterations in two or more of the following measurements in the last three months are excluded of the study: transaminases (TGO, TGP), gama GT, alkaline phosphatase, protrombin time (PT), RNI, KTTP, albumin, bilirubin, creatinine, sodium, potassium, ionic calcium, urea, VSG, protein C reactive and hemogram with leucogram. Volunteers were invited to participate in the study and were prospectively enrolled at Neurological and Rehabilitation Service of HUSM, Santa Maria-RS-Brazil.

After laboratory analyses, we subdivided stroke group in two subgroups: dyslipidemic stroke (<sub>d</sub>stroke) and non-dyslipidemic stroke (<sub>nd</sub>stroke) to investigate if

could be an association between inflammatory and apoptotic markers with lipid parameters.

### **Control group**

To comparisons, 40 subjects without any disease and respecting the mean age and gender of the stroke group.

### **Risk Factor Analysis**

Hypertension, diabetes mellitus, and dyslipidemia were diagnosed by internal medicine specialists. Hypertension was diagnosed if subjects were taking antihypertensive agents or had a systolic blood pressure of  $\geq 140$  mm Hg or diastolic blood pressure of  $\geq 90$  mm Hg. Diabetes mellitus was diagnosed if subjects were taking oral antihyperglycemic agents or insulin or if their fasting blood glucose level was  $\geq 100$  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  $\geq 150$  mg/dl, or a high-density lipoprotein cholesterol level of  $\geq 160$  mg/dl. Smoking status was recorded as non-smoker or current smoker (if they had quit at least 6 months before).

### **Laboratory analyses**

Blood samples were collected after 12 h overnight fasting by venous puncture into gray, purple, green and red top Vacutainers® (BD Diagnostics, Plymouth, UK) tubes 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 total cholesterol, LDL and HDL cholesterol, triglyceride, urea, creatinine, TGO, TGP, alkaline phosphatase, AChE and caspases all these

concentrations were measured using standard enzymatic methods by use of Ortho-Clinical Diagnostics® reagents on the fully automated analyzer (Vitros 950® dry chemistry system; Johnson & Johnson, Rochester, NY, USA). High-density lipoprotein cholesterol was measured as previously described (Bachorik and Albers, 1986). Low-density lipoprotein cholesterol was estimated with the Friedewald equation (Friedewald et al., 1972). Plasma EDTA was used to dosage of DCFH and glycated hemoglobin A1C (HbA1C). HbA1C was realized by Bio-Rad Variant II system, with HPLC by ionic change. Plasma with heparin was used to analyze DNA damage (PG). Tubes no anticoagulant was used to dosage serum levels of NO<sub>x</sub>. Protein was measured by the method of Bradford using bovine serum albumin as a standard (Bradford, 1976).

### **Reactive species determination**

The ROS level was determined using the non-fluorescent cell permeating compound 2'-7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) assay as described by Esposti (2002).

Determination of serum levels of nitrite/nitrate (NO<sub>x</sub>) as described by Tastch et al (2011). NO<sub>x</sub> was measured by the modified Griess method using the Cobas Mira automated analyzer. All incubations were at 37 °C and results were expressed in μmol/L.

### **AChE Enzyme determination**

The enzyme AChE concentration was measured in serum by standard enzymatic methods using Ortho-Clinical Diagnostics ® reagents in automated analyzer (Vitros 950 ® dry chemistry system; Johnson & Johnson, Rochester, NY).

### **TNF- $\alpha$ Determination**

The TNF- $\alpha$  quantification was assessed by ELISA using commercial kits for human (eBIOSCIENCE, San Diego, USA), according to manufacturer's instructions.

### **Caspases Determination**

CASP 8 and 3 activities were determined by Assay Kits, Fluorimetric (BioVision, Mountain View, CA). The fluorescence intensity of CASP 8 and CASP 3 were recorded at wavelength of 400 nm for excitation, and at wavelength of 505 nm for emission. The activity of caspases were calculated as Fluorescence intensity (FI)/min/ml= $\Delta FIt/(t \times v)$ , where  $\Delta FIt$ =difference in fluorescence intensity between time zero and time t minutes, t=reaction time in min, and v=volume of sample in ml.

### **DNA Damage**

The DNA damage was measured through the Picogreen test. The Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Reagent (Invitrogen®) is a fluorescent reagent ultra sensible for quantification DNA ribbons doubles in solution, which can detect very small concentrations of DNA up to 25 pg/mL. This technique can be used for the quantification of DNA released into the middle due to cell apoptosis and to genotoxicity when you use the pure DNA molecule exposed to a particular compound. The technique was applied as described by HÁ et al (2011).

### **Statistical Analysis**

Data were analyzed by unpaired *t* test or one-way ANOVA when appropriated, and were expressed as means and standards error of the mean (SEM). *Post hoc*



analysis was carried out by the Student-Newman-Keuls test. Statistical analyses were performed using the SPSS (statistical Package for the Social Sciences) software in a PC-compatible computer. Correlation analyses were carried out using the Pearson's correlation coefficient.  $P < 0.05$  was considered significant.

## RESULTS

Eighty subjects were investigated in this study, consisting of 40 subjects post-stroke and 40 controls. Baseline characteristics of the study population are described in Table 1. Statistical analysis showed that means of age, sex, BMI, hypertension, smokers, diabetes and sedentary are significant higher in the stroke group ( $p < 0.05$ ) as compared to control group. The stroke time was higher than 6 months between study patients.

Clinical characteristics of the study subjects are shown in Table 2. Statistical analysis showed that values of glucose, HBA1C, total cholesterol, LDL cholesterol, triglycerides, urea, TGP and alkaline phosphatase are significantly higher in the stroke group in comparison with control.

Statistical analysis showed that stroke group had significantly higher DCF ( $33018 \pm 2085$  fluorescence absorbance;  $t=7.13$ ;  $df=48$ ,  $p < 0.0001$ ) and  $\text{NO}_x$  ( $338.8 \pm 29.3 \mu\text{mol/L}$ ;  $t=4.76$ ;  $df=78$ ;  $p < 0.0001$ ) determination than healthy controls ( $18078 \pm 198.1$  fluorescence absorbance and  $177.9 \pm 16.8 \mu\text{mol/L}$ ; respectively Fig. 2A-B).

Statistical analysis revealed that stroke group had significantly higher serum levels of  $\text{TNF-}\alpha$  ( $262.8 \pm 10.4 \text{ pg/ml}$ ;  $t=13.9$   $df=78$ ,  $p < 0.0001$ ), AChE ( $1609 \pm 61.4 \text{ U/L}$ ;  $t=7.95$   $df=78$ ,  $p < 0.0001$ ), CASP 8 ( $164.6 \pm 16.9 \text{ pg/ml}$ ;  $t=6.72$ ;  $df=78$ ;  $p < 0.0001$ ), and CASP 3 ( $142.9 \pm 16.6 \text{ pg/ml}$ ,  $t= 6.84$ ;  $df=78$ ;  $p < 0.0001$ ) than controls group ( $114.9 \pm 2.2$ ;  $1113 \pm 11.35$ ;  $50.1 \pm 1.3$  and  $28.9 \pm 0.87$ ; respectively Fig. 3A-D).

The PG test has demonstrated in figure 3E. Statistical analysis revealed that stroke group had significantly higher plasma levels ( $58.6 \pm 5.5$  pg/ml;  $t = 7.77$ ;  $df = 78$ ;  $p < 0.0001$ ) vs. control ( $14.7 \pm 1.4$ ).

Since inflammatory pathways have a close relationship with apoptotic factors, we decided to correlate TNF- $\alpha$  levels with CASP 8 and 3 activation. Correlation analyses (Pearson's correlation coefficient) revealed that the TNF- $\alpha$  levels positively correlated with CASP 8 ( $r = 0.430$ ;  $p < 0.05$ —Fig. 4A) and 3 activation ( $r = 0.420$ ;  $p < 0.05$ —Fig. 4B), but not with DCF production, NO $_x$  or AChE levels ( $p > 0.05$ ; data not shown).

Furthermore, we showed that  $\Delta$ stroke had significantly higher serum levels of TNF- $\alpha$ , CASP 3, CASP 8 and AChE vs.  $\Delta$ stroke and vs. control groups. The  $\Delta$ stroke group had significantly higher serum levels of TNF- $\alpha$  compared to total CHO [F(2,77)= 111.7;  $p < 0.0001$ ], LDL [F(2,77)= 120.2;  $p < 0.0001$ ], HDL [F(2,77)= 103.8;  $p < 0.0001$ ], and TG [F(2,77)= 116.4;  $p < 0.0001$ ] vs.  $\Delta$ stroke and vs. control groups (Fig. 5 A-D). Statistical analysis also showed that  $\Delta$ stroke group had significantly higher serum levels of AChE compared to total CHO [F(2,77)= 41.7;  $p < 0.0001$ ], LDL [F(2,77)= 41.75;  $p < 0.0001$ ], HDL [F(2,77)= 44.8;  $p < 0.0001$ ], and TG [F(2,77)= 42.4;  $p < 0.0001$ ] vs.  $\Delta$ stroke and vs. control groups (Fig. 5 E-H).

In addition, we observed that  $\Delta$ stroke group had significantly higher serum levels of CASP 8 compared to total CHO [F(2,77)= 37.3;  $p < 0.0001$ ], LDL [F(2,77)= 42.8  $p < 0.0001$ ], HDL [F(2,77)= 34.2;  $p < 0.0001$ ], and TG [F(2,77)= 44.8;  $p < 0.0001$ ] vs.  $\Delta$ stroke and vs. control groups (Fig. 6 A-D). Moreover, statistical analysis revealed that  $\Delta$ stroke group had significantly higher serum levels of CASP 3 compared to total CHO [F(2,77)= 38.5;  $p < 0.0001$ ], LDL [F(2,77)= 44.6  $p < 0.0001$ ],

HDL [ $F(2,77)= 36.5$ ;  $p < 0.0001$ ], and TG [ $F(2,77)= 42.5$ ;  $p < 0.0001$ ] vs.  $_{nd}$ stroke and vs. control groups (Fig. 6 E-H).

The results expressed any difference in oxidative stress, inflammatory and apoptotic parameters when comparing patients on monotherapy ( $p > 0.05$ ) and polytherapy ( $p > 0.05$ ) (data not shown).

## DISCUSSION

The present study, our results showed significant increase of DCFH,  $NO_x$ , TNF- $\alpha$  and AChE levels as well as PG, CASP 8 and 3 levels in the late stroke group as compared to healthy control. We also showed that increased levels of TNF- $\alpha$  was correlated to apoptotic markers (CASP 8 and 3), but not oxidative stress (DCFH and  $NO_x$ ). Interestingly, higher levels of inflammatory (TNF- $\alpha$  and AChE) and apoptotic (CASP 8 and 3) markers were found in the dyslipidemic post-stroke ( $_{d}$ stroke) compared to non-dyslipidemic post-stroke ( $_{nd}$ stroke) patients and controls, suggesting a link among these events in a later phase of cerebral injury.

The pathophysiology of stroke is complex and involves numerous processes, including: energy failure, free radical-mediated toxicity, cytokine-mediated cytotoxicity, complement activation, and infiltration of leukocytes (Love, 1999). Evidences suggest that oxidative stress, neuroinflammation and apoptosis are linked to acute stroke phenomena (Chong et al., 2005; Yamamoto et al., 2008), but little is known about these events in a later phase of stroke.

It is likely that dysregulation of the cerebral circulation compromises perfusion of the post-ischemic brain, and would thus adversely impact stroke outcome by increasing the likelihood of vascular impairment and secondary damage of stroke. While much research has sought to understand the mechanisms of acute neuronal

injury following stroke, relatively little attention has been devoted to the identification of factors later cerebrovascular dysfunction.

It is known that reactive species levels in the cerebral circulation increase dramatically during the initial stages of post-ischemic reperfusion (de Silva, 2011), and that this state of oxidative stress may persist for several days (Miller et al., 2006). Studies have previously reported that free radical levels, such as superoxide, are increased in the cerebral circulation during stroke (Miller et al., 2005; Miller et al., 2009), and could result in a lower threshold for oxidative toxicity in cerebral vessels. In fact, superoxide radical may react avidly with nitric oxide (NO) leading to decreased NO bioavailability and increased formation of nitrosative species highly reactive and damaging that may contribute to neuronal injury.

In line this view, Parizadeh et al. (2011) showed increased levels of serum prooxidant-antioxidant balance in patients with stroke, indicating a heightened state of oxidative stress compared to control group, but were not significantly different in patients with different outcomes based on their 6-month prognosis. Thus, increased DCFH and NO<sub>x</sub> levels (Fig. 2A-B) represent the increase of oxidative/nitrosative species generation, which may collaborate to brain injury even in the late phase of stroke. One explanation to persistent increase of reactive species levels, it is a possible mutation of antioxidant enzymes, such as manganese superoxide dismutase (MnSOD). The functional polymorphism V16A affects the localization of MnSOD and therefore its ability to scavenge superoxide radicals and this could contribute to raise reactive species production (Duarte et al., 2010). However, the reason for the persistent increase of oxidative/nitrosative stress is not clear and merits further study.

It is also worth remarking that, in individual basis, we found no correlation

between oxidative/nitrosative damage marker increase and stroke, making difficult to postulate a cause–effect relationship between reactive species generation and chronic cerebral injury. Notwithstanding, one might also consider the possibility that selected targets, which could not contribute significantly to the total oxidative/nitrosative stress, could collaborate to brain injury, such as inflammatory markers (i.e. TNF- $\alpha$  and AChE).

In fact, studies show that inflammatory markers were correlated with brain infarction volume, stroke severity and clinical outcome (Vila et al., 2000; Di Napoli, 2002; Elkind et al., 2004), but the underlying inflammatory reactions and the correlation between these factors in the late stroke await further validations.

According, many authors reports that brain inflammation has been implicated as a crucial contributor to the etiopathogenesis of several CNS disorders, including stroke (Vila et al., 2000; Di Napoli and Papa, 2002; Lambersten et al., 2012; Shichita et al., 2012). It has been demonstrated that AChE has an important role in immune responses by rapidly hydrolyzing acetylcholine (ACh) (Kawashima and Fujii, 2000), which is known to have antiinflammatory characteristics and suppresses the production of proinflammatory cytokines (Kawashima and Fujii, 2003; Borovikova et al. (2000). Here, we observed an increase in the AChE activity in the patients in the late phase of stroke. It is possible that this alteration leads to a decrease of the ACh level contributing to the proinflammatory status. Although the role of the cholinergic system in stroke is still unclear, our findings suggest the hypothesis that AChE may antagonize vagal cholinergic signaling at macrophage level (Ofek, et al. 2007; Shaked, et al., 2009), promoting an effect systemic inflammatory (increase of TNF- $\alpha$ ) and apoptotic response (CASP 8 and 3 activation). In fact, increased TNF- $\alpha$  levels may exacerbate the ligation to its receptors and lead to activation of executers

caspases, like caspase-8, by extrinsic apoptotic pathway (Micheau and Tschopp, 2003; Schneider-Brachert et al., 2004). Caspase 8 combined with its ability to induce apoptosis through the extrinsic pathway, also triggers the intrinsic apoptotic pathway by cleavage of the members of the family of pro-apoptotic factor Bcl-2 to initiate the apoptotic process induced by mitochondria (Gross et al., 1999; Zhao et al., 2001). These events may induce a subsequent increase in reactive species, leading to activation of caspase 3 and DNA damage (Namura et al., 1998; Budihardjo et al., 1999; Sugawara et al., 2004), as observed in our study (Fig. 2 and Fig. 3D-E).

Reinforcing this hypothesis, we showed a positive correlation among levels of TNF- $\alpha$  with CASP 8 and 3, suggesting that these markers may be still elevated in the late phase of stroke. In accordance, McCoy and Tansey (2008) reported that elevation of soluble TNF may be a hallmark of acute and chronic neuroinflammation in the number of neurodegenerative conditions.

Interestingly, our data showed a significant difference in dyslipidemia levels among groups of study. Thus, we explored if there is a relationship among inflammatory and apoptotic markers with the components of dyslipidemia in the stroke and control group. The results presented in this report revealed that AChE, TNF- $\alpha$ , CASP 3 and CASP 8 were positively associated with TG, total cholesterol, LDL and HDL. In figures 5 and 6, stroke patients had significantly higher serum levels of TNF- $\alpha$ , CASP 3, CASP 8 and AChE when compared to non-stroke or control groups.

In fact, studies have shown an association between LDL and TG with inflammatory factors (Alvarez-Sala et al., 2008; Keles et al., 2008; Martinez-Hervas et al., 2010). Holm et al. (2011) showed that high plasma levels of fatty acid binding proteins (FABP4) were significantly associated with increase of oxidized LDL and cardiovascular mortality in the acute post-stroke, suggesting a relationship with

atherogenesis. These same authors have also revealed a link between platelet activation and enhanced expression of FABP4 within macrophages, partly dependent of pre-activation with TNF- $\alpha$ . Thus, taken together our findings, it is plausible to propose that inflammatory (TNF- $\alpha$  and AChE) and apoptotic (CASP 3 and 8) markers are increased in the late phase of stroke and that dyslipidemia may increase levels of these markers, contributing with new neurovascular events.

Therefore, we suggest that the events detected in this study may contribute, at least in part, to the encephalic dysfunction found in the late stroke, and that the use of drugs with antiinflammatory potential could represent a complementary therapy in the treatment of these patients.

### **Competing interests**

The authors declare that they have no competing interests.

### **Authors' contributions**

MRF and ETP drafted and wrote the manuscript. LFFR, RNM and AEF commented and revised the manuscript. AK, GVB and PG collected blood samples and measured the DCFH and NO<sub>x</sub> levels. TDA, IBMC and MMFD measured level of AChE, TNF- $\alpha$ , CASP 8 and 3. ALCP was responsible to recruit all patients. All authors have read and approved the final version of the manuscript.

### **Acknowledgments**

Work supported by CNPq (grant: 500120/2003-0) and PROIC, M.R. Figuera, L.F. F. Royes, I. B. M da Cruz, RNM are the recipients of CNPq fellowships. The G.V.Bochi, A. Kegler, E. T. Pascotini and P. Gabbi are the recipient of CAPES

fellowships. The authors thank Ana Paula O. Ferreira by technical assistance in the biochemical experiments.

## References

- Alvarez-Sala LA, Cachofeiro V, Masana L, Suarez C, Pinilla B, Plana N, Trias, F. Moreno MA, Gabus, G. Lahera, V. Pinto, X (2008) Effects of fluvastatin extended-release (80 mg) alone and in combination with ezetimibe (10 mg) on low-density lipoprotein cholesterol and inflammatory parameters in patients with primary hypercholesterolemia: a 12-week, multicenter, randomized, open-label, parallel-group study. *Clin Ther* 30, 84–97.
- Bachorik PS, Albers JJ. (1986) Precipitation methods for quantification of lipoproteins. *Methods Enzymol*;129:78–100.
- Banati RB, Gehrman J, Schubert P. Kreutzberg GW. (1993) Cytotoxicity of microglia. *Glia*, vol. 7, no. 1, pp. 111–118.
- Ben-Assayag E, Shenhar-Tsarfaty S, Ofek K, Soreq L, Bova I, Shopin L, Berg MG, Berliner S, Shapira I, Bornstein NM, Soreq H. (2010) Serum cholinesterase activities distinguish between stroke patients and controls and predict 12-month mortality. *Mol Med* 16(7-8):278-286.
- Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, Wang H, Abumrad N, Eaton JW, Tracey KJ. (2000) Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature.*; 405(6785):458-62.
- Bradford MM. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*;72:248–54.
- Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X. (1999) Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol.*;15:269-90. Review.
- 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.
- Chong ZZ, Li FQ, Maiese K. (2005) Oxidative stress in the brain: Novel cellular targets that govern survival during neurodegenerative disease. *Progress in Neurobiology*, 75:207-46.
- De Silva TM, Brait VH, Drummond GR, Sobey CG, Miller AA. (2011) Nox2 Oxidase Activity Accounts for the Oxidative Stress and Vasomotor Dysfunction in Mouse Cerebral Arteries following Ischemic Stroke. *PlosOne*: 6(12).
- Di Napoli M, Papa F. (2002) Inflammation, hemostatic markers, and antithrombotic agents in relation to long-term risk of new cardiovascular events in first-ever ischemic stroke patients. *Stroke.* 33:1763–71.
- Duarte MM, Moresco R, Duarte T, Santi A, Bagatini MD, Da Cruz IBM, Schetinger MRC, Loro VL. (2010) Oxidative stress in hypercholesterolemia and its association with Ala16Val superoxide dismutase gene polymorphism. *Clin Biochem*, doi:10.1016/j.clinbiochem.2010.07.002.
- Elkind MS, Cheng J, Rundek T, Boden-Albala B, Sacco RL. (2004) Leukocyte count predicts outcome after ischemic stroke: the Northern Manhattan Stroke Study. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* 13:220–7.
- Esposti, MD. (2002) Measuring mitochondrial reactive oxygen species. *Methods.* v. 26, p. 335-340.



- Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. (1972) Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without the use of preparative ultracentrifuge. *Clin Chem*;18:499–502.
- 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.
- Gross A, Yin XM, Wang K, Wei M, Jockel J, Milliman C, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Korsmeyer J. (1999) Caspase cleaved bid targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while bcl-xl prevents this release but not tumor necrosis factor-r1/fas death. *J of Bio Chem*, Vol. 274, No. 2, Issue of January 8, pp. 1156 –1163.
- Ha TT, Huy NT, Murao LA, Lan NT, Thuy TT, Tuan HM, Nga CT, Tuong VV, Dat TV, Kikuchi M, Yasunami M, Morita K, Huong VT, Hirayama K. (2011) Elevated levels of cell-free circulating DNA in patients with acute dengue virus infection. *PLoS One*. 2011;6(10):e25969. doi: 10.1371/journal.pone.0025969.
- Halvorsen B, Otterdal K, Dahl TB, Skjelland M, Gullestad L, Oie E, Aukrust P. (2008) Atherosclerotic plaque stability--what determines the fate of a plaque? *Prog Cardiovasc Dis* 51: 183–194.
- Hansson GK. (2005) Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 352: 1685–1695.
- Holm S, Ueland T, Dahl TB, Michelsen AE, Skjelland M, Russell D, Nymo SH, Krohg-Sorensen K, Clausen OP, Atar D, Januzzi JL, Aukrust P, Jensen JK, Halvorsen B. (2011) Fatty acid binding protein 4 is associated with carotid atherosclerosis and outcome in patients with acute ischemic stroke. *PLoS One*; 6(12):e28785. doi: 10.1371/journal.pone.0028785.
- Kawashima K, Fujii T. (2000) Extraneuronal cholinergic system in lymphocytes. *Pharmacol Ther*. 2000 Apr; 86(1):29-48.
- Kawashima, K, Fujii T. (2003) The lymphocytic cholinergic system and its contribution to the regulation of immune activity. *Life Sci.*; 74(6):675-96.
- Keles T, Akar Bayram N, Kayhan T, Canbay A, Sahin D, Durmaz T, Ozdemir O, Aydogdu S, Diker E. (2008) The comparison of the effects of standard 20 mg atorvastatin daily and 20 mg atorvastatin every other day on serum LDL-cholesterol and high sensitive C-reactive protein levels. *Anadolu Kardiyol Derg* 8,407–412.
- Lambertsen KL, Biber K, Finsen B. (2012) Inflammatory cytokines in experimental and human stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*, 32:1677–1698.
- Love, S. (1999) Oxidative stress in brain ischemia. *Brain Pathology*, 9:119-31.
- Mahalle N, Garg M, Kulkarni M, Naik S. (2014) Association of inflammatory cytokines with traditional and nontraditional cardiovascular risk factors in indians with known coronary artery disease. *Ann Med Health Sci Res*. Sep;4(5):706-12.
- Martinez-Hervas S, Real JT, Ivorra C, Priego A, Chaves FJ, Pallardo FV, Vina JR, Redon J, Carmena R, Ascaso JF. (2010) Increased plasma xanthine oxidase activity is related to nuclear factor kappa beta activation and inflammatory markers in familial combined hyperlipidemia. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 20,734–739.

- McCoy MK, Tansey MG. (2008) TNF signaling inhibition in the CNS: implications for normal brain function and neurodegenerative disease. *Journal of Neuroinflammation*, Oct 17 5:45.
- Micheau O, Tschopp J. (2003) Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell*. Jul 25;114(2):181-90.
- Miller AA, Drummond GR, De Silva TM, Mast AE, Hickey H, Willians JP, Broughton BR, Sobey CG. (2009) NADPH oxidase activity is higher in cerebral versus systemic arteries of four animal species: role of Nox2. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 296: H220–225.
- Miller AA, Drummond GR, Schmidt HH, Sobey CG (2005) NADPH oxidase activity and function are profoundly greater in cerebral versus systemic arteries. *Circ Res* 97: 1055–1062.
- Miller AA, Dusting GJ, Roulston CL, Sobey CG (2006) NADPH-oxidase activity is elevated in penumbral and non-ischemic cerebral arteries following stroke. *Brain Res* 1111: 111–116.
- Nakajima K, Kohsaka S. (2001) Microglia: activation and their significance in the central nervous system. *Journal of Biochemistry*, vol. 130, no. 2, pp. 169–175.
- Namura S, Zhu J, Fink K, Endres M, Srinivasan A, Tomaselli KJ, Yuan J, Moskowitz MA. (1998) Activation and cleavage of caspase-3 in apoptosis induced by experimental cerebral ischemia. *J Neurosci*; 18:3659-3668.
- Norrving B, Kessela B. (2013) The global burden of stroke and need for a continuum of care. *Neurology*, Jan 15;80 (3 Suppl 2): S5-12.
- Ofek K, Krabbe KS, Evron T, Debecco M, Nielsen AR, Brunnsaad H, Yirmiya R, Soreq H, Pedersen BK. (2007) Cholinergic status modulations in human volunteers under acute inflammation. *J. Mol. Med.* 85:1239–51.
- Parizadeh MR1, Azarpazhooh MR, Mobarra N, Nematy M, Alamdari DH, Tavalai S, Sahebkar A, Hassankhani B, Ferns G, Ghayour-Mobarhan M. (2011) Prooxidant-antioxidant balance in stroke patients and 6-month prognosis. *Clin Lab.*;57(3-4):183-91.
- Rothwell N, Allan S, Toulmond S. (1997) The role of interleukin 1 in acute neurodegeneration and stroke: pathophysiological and therapeutic implications. *J Clin Invest.* Dec 1;100(11):2648-52.
- Schneider-Brachert W, Tchikov V, Neumeyer J, Jakob M, Winoto-Morbach S, Held-Feindt J, Heinrich M, Merkel O, Ehrenschwender M, Adam D, Mentlein R, Kabelitz D, Schütze S. (2004) Compartmentalization of TNF receptor 1 signaling: internalized TNF receptosomes as death signaling vesicles. *Immunity*. Sep;21(3):415-28.
- Shaked I, Meerson A, Wolf Y, Avni R, Greenberg D, Gilboa-Geffen A, Soreq H. (2009) MicroRNA-132 potentiates cholinergic anti-inflammatory signaling by targeting acetylcholinesterase. *Immunity*. 31:965–73 cover. Accompanied by preview O’Neil, L.A.J. (2009) Boosting the brain’s ability to block inflammation via microRNA-132. *Immunity*. 31:854–5.
- Shichita TG, Sakaguchi TR, Suzuki M, Yoshimura A. (2012) Post-ischemic inflammation in the brain. *Frontier In.*, Volume 3; Article 132.
- Sugawara T, Fujimura M, Noshita N, Noshita N, Kim GW, Saito A, Hayashi T, Narasimhan P, Maier CM, Chan PH. (2004) Neuronal death/survival signaling pathways in cerebral ischemia. *Neuro Rx.*;1:17-25.
- 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.

- Vila N, Castillo J, Davalos A, Chamorro A. (2000) Proinflammatory cytokines and early neurological worsening in ischemic stroke. *Stroke*. 31:2325–9.
- Yamamoto E, Tamamaki N, Nakamura T, Kataoka K, Tokutomi Y, Dong YF, Fukuda M, Matsuba S, Ogawa H, Kim-Mitsuyama S. (2008) Excess salt causes cerebral neuronal apoptosis and inflammation in stroke-prone hypertensive rats through angiotensin II-induced NADPH oxidase activation. *Stroke*,39:3049-56.
- 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.
- World Health Organization World Health Report 2010, 2010. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Zhao Y, Li S, Childs EE, Kuharsky D, Yin XM. (2001) Activation of pro-death bcl-2 family proteins and mitochondria apoptosis pathway in tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced liver injury. *J of Bio Chem*, Vol. 276, No. 29, Issue of July 20, pp.27422-27

**Table 1:** Baseline characteristics of study subjects.

Characteristic	Stroke Group (n=40)	Control Group (n=40)	<i>p</i> -Value
n	40	40	
Age	63 $\pm$ 2.1	56 $\pm$ 1.6	>0.05
Male (%)	67.5	55	>0.05
BMI (Kg/ m <sup>2</sup> )	26.7 $\pm$ 0.3	22.4 $\pm$ 0.5	<0.0001
Hypertension (%)	82.5	0	<0.0001
Smokers (%)	5	0	>0.05
Sedentary (%)	47.5	0	<0.05

BMI = Body Mass Index. Data are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) or percentage. Significant Values =  $p < 0.05$ .

**Table 2:** Clinical characteristics of study subjects.

Biomarker	Stroke Group (n=40)	Control Group (n=40)	<i>p</i> value
Glucose (mg/dl)	97.9 $\pm$ 4.2	81.5 $\pm$ 1.1	<0.001
HBA1C (%)	5.22 $\pm$ 0.2	4.7 $\pm$ 0.08	<0.05
Cholesterol (mg/dl)	189 $\pm$ 7.9	150.3 $\pm$ 2.2	<0.0001
HDL (mg/dl)	51.05 $\pm$ 2.1	55.2 $\pm$ 1.4	>0.05
LDL (mg/dl)	110 $\pm$ 8.3	75.45 $\pm$ 2.5	<0.001
Triglycerides (mg/dl)	143 $\pm$ 9.5	102.2 $\pm$ 6.1	<0.001
Urea (mg/dl)	24.9 $\pm$ 0.9	18.5 $\pm$ 0.6	<0.0001
Creatinin (mg/dl)	0.77 $\pm$ 0.03	0.85 $\pm$ 0.03	>0.05
TGO (UI/ml)	29.1 $\pm$ 1.3	25.5 $\pm$ 1.2	>0.05
TGP (UI/ml)	31.02 $\pm$ 1.2	28.24 $\pm$ 0.6	<0.05
AP (UI/ml)	56.42 $\pm$ 2.9	83.4 $\pm$ 1.3	<0.0001

AP – Alkaline Phosphatase. Data are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Significant Values =  $P < 0.05$ .

## Figure Legends

**Figure 1:** Flowchart showing the total participants recruited, total remaining after the exclusion criteria and experimental design of the study.

**Figure 2:** The values of DCF (A) and NOx (B) levels in control and stroke groups. Increase of DCF and serum NOx levels in the post-stroke patients as compared to control group. Data represents mean + SEM for  $n = 40$  in each group. According to unpaired t test,  $*p < 0.0001$  was considered significant.

**Figure 3:** The values of TNF- $\alpha$  (A), AChE (B), Caspase 8 (C), Caspase 3 (D) and Picogreen (E) levels in control and stroke groups. Increase of serum TNF- $\alpha$ , AChE, Caspase 8 and Caspase 3 levels as well as plasma picogreen determination in the post-stroke patients as compared to control group. Data represents mean + SEM for  $n = 40$  in each group. According to unpaired t test,  $*p < 0.0001$  was considered significant.

**Figure 4:** Correlation among inflammatory and apoptotic markers in the control and stroke groups.

Increased serum TNF- $\alpha$  concentration correlates with activation of CASP 8 ( $r=0.40$ ;  $p < 0.05$  – Figure 4 A) and CASP 3 ( $r=0.4$ ;  $p < 0.05$  – Figure 4B) in the stroke patients as compared to control group (Pearson's correlation coefficient). Data represents mean + SEM for  $n = 40$  in each group. According to Pearson's correlation coefficient,  $p < 0.05$  was considered significant.

**Figure 5:** Comparison of Non-dyslipidemic Stroke (ndStroke) ( $n=29$ ) Dyslipidemic Stroke (dStroke) ( $n=11$ ) and control groups in relation to inflammatory markers.

The dStroke group had higher serum TNF- $\alpha$  concentration as compared to total CHO (A), LDL (B), HDL (C) and TG (D) vs. ndStroke vs. control group. The dStroke group had higher serum AChE levels as compared to total CHO (E), LDL (F), HDL (G) and

TG (H) vs. ndStroke vs. control group. Data represents mean + SEM for  $n = 40$  in each group. According to one-way ANOVA,  $p < 0.0001$  was considered significant.

**Figure 6:** Comparison of Non-dyslipidemic Stroke (ndStroke) ( $n=29$ ), Dyslipidemic Stroke (dStroke) ( $n=11$ ) and control groups in relation to apoptotic markers.

The dStroke group had higher serum caspase 8 activation as compared to total CHO (A), LDL (B), HDL (C) and TG (D) vs. ndStroke vs. control group. The dStroke group had higher serum caspase 3 activation as compared to total CHO (E), LDL (F), HDL (G) and TG (H) vs. ndStroke vs. control group. Data represents mean + SEM for  $n = 40$  in each group. According to one-way ANOVA,  $p < 0.0001$  was considered significant.

Figure 1

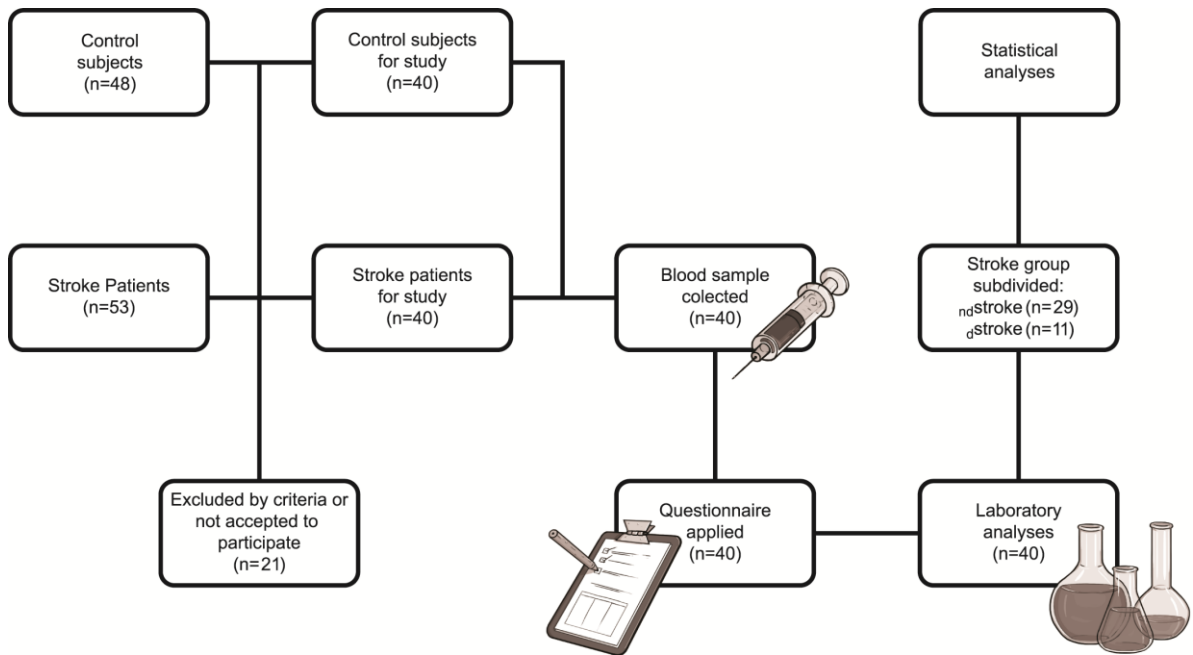


Figure 2

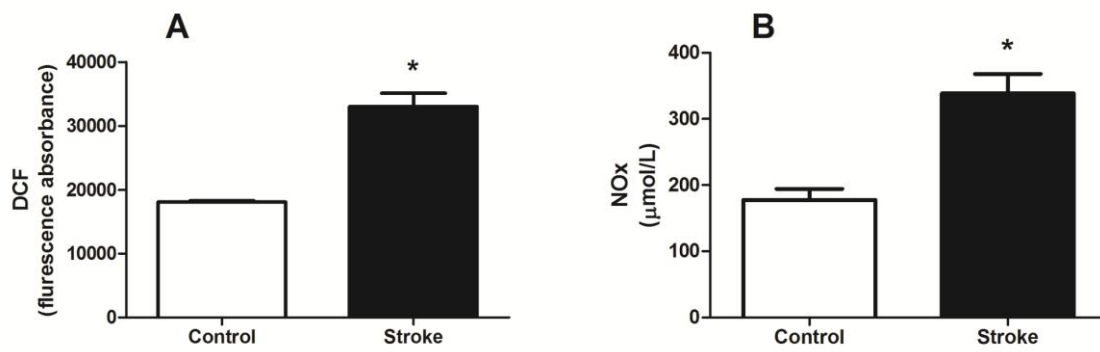


Figure 3

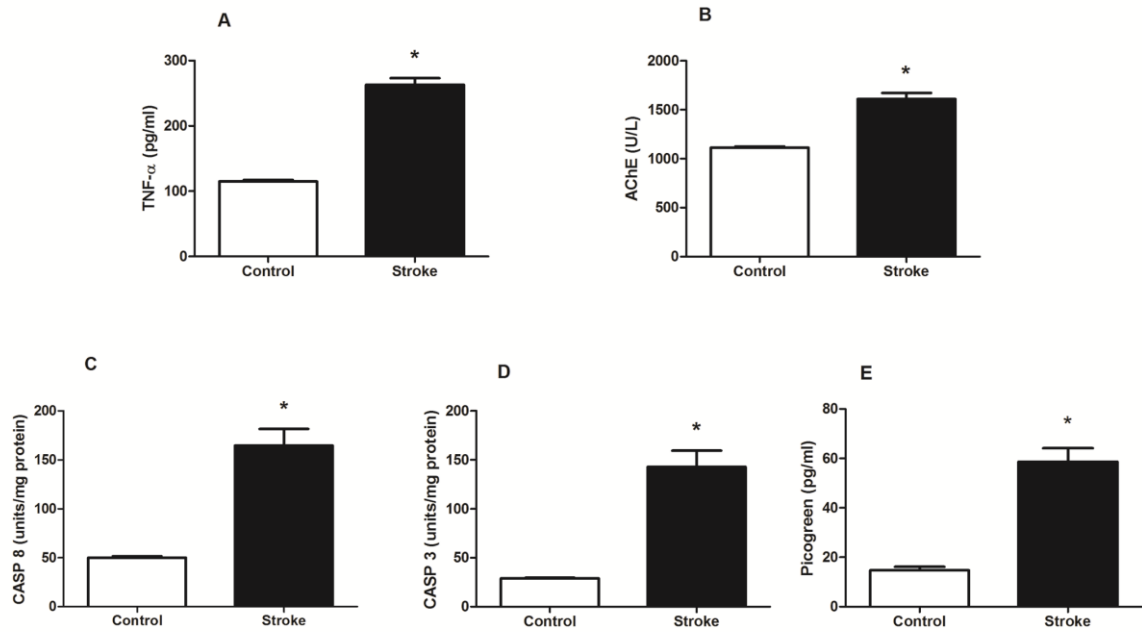


Figure 4

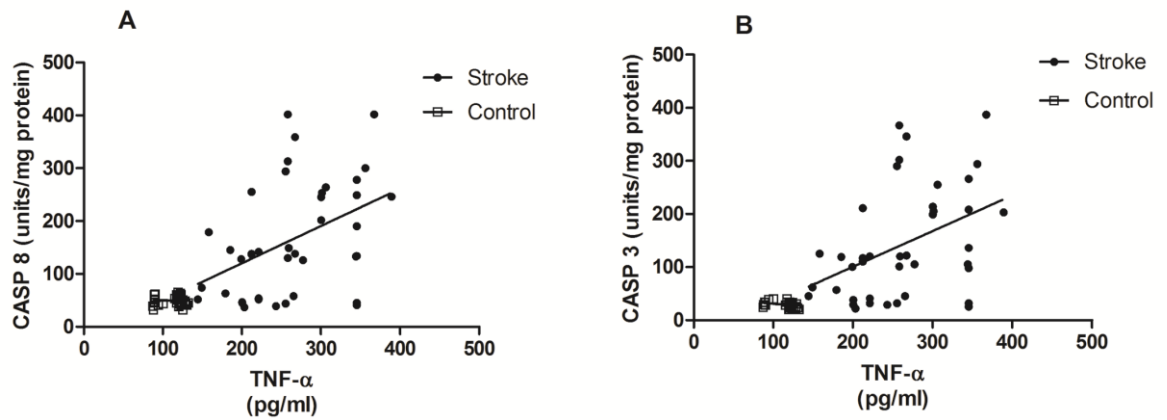


Figure 5

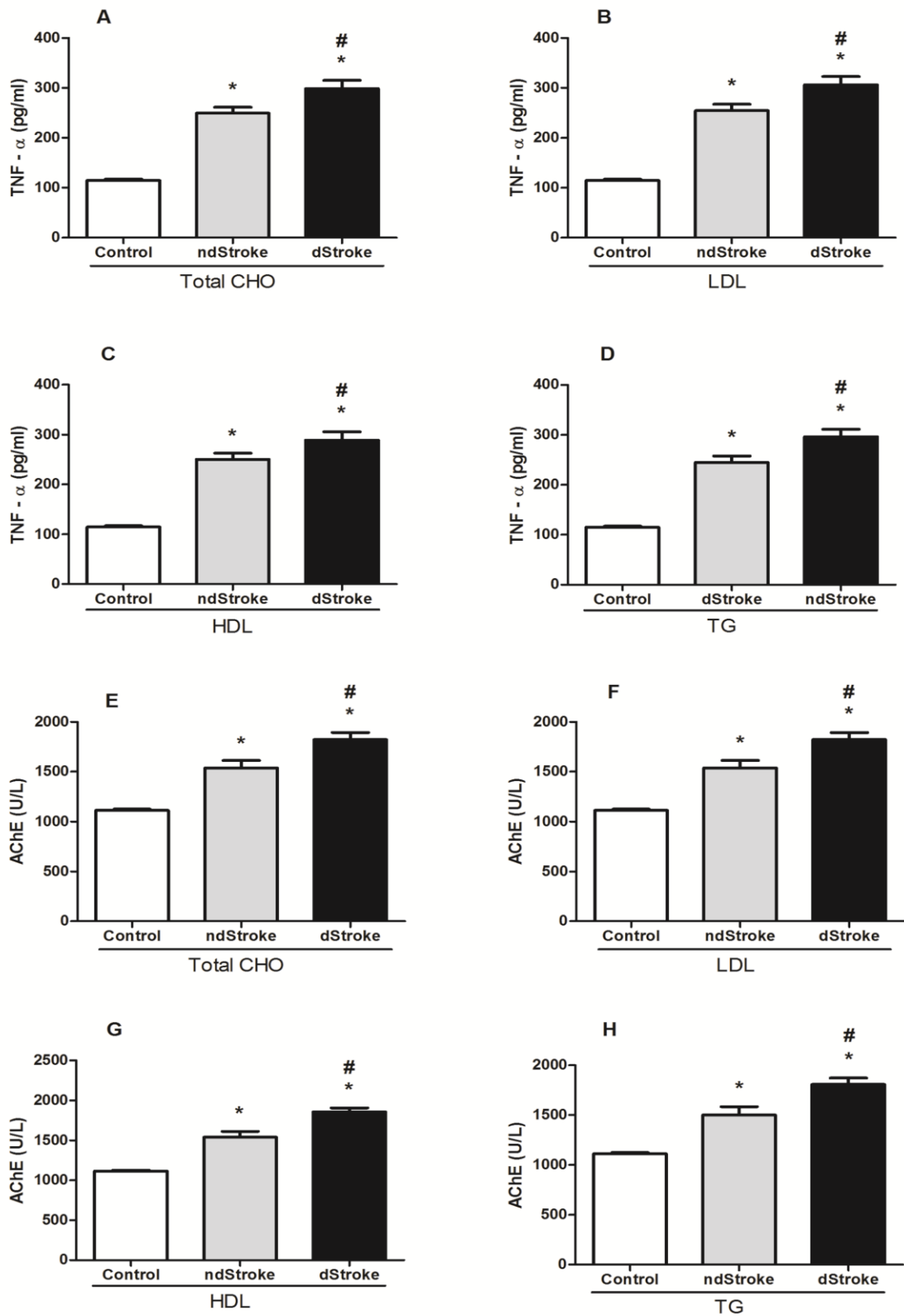
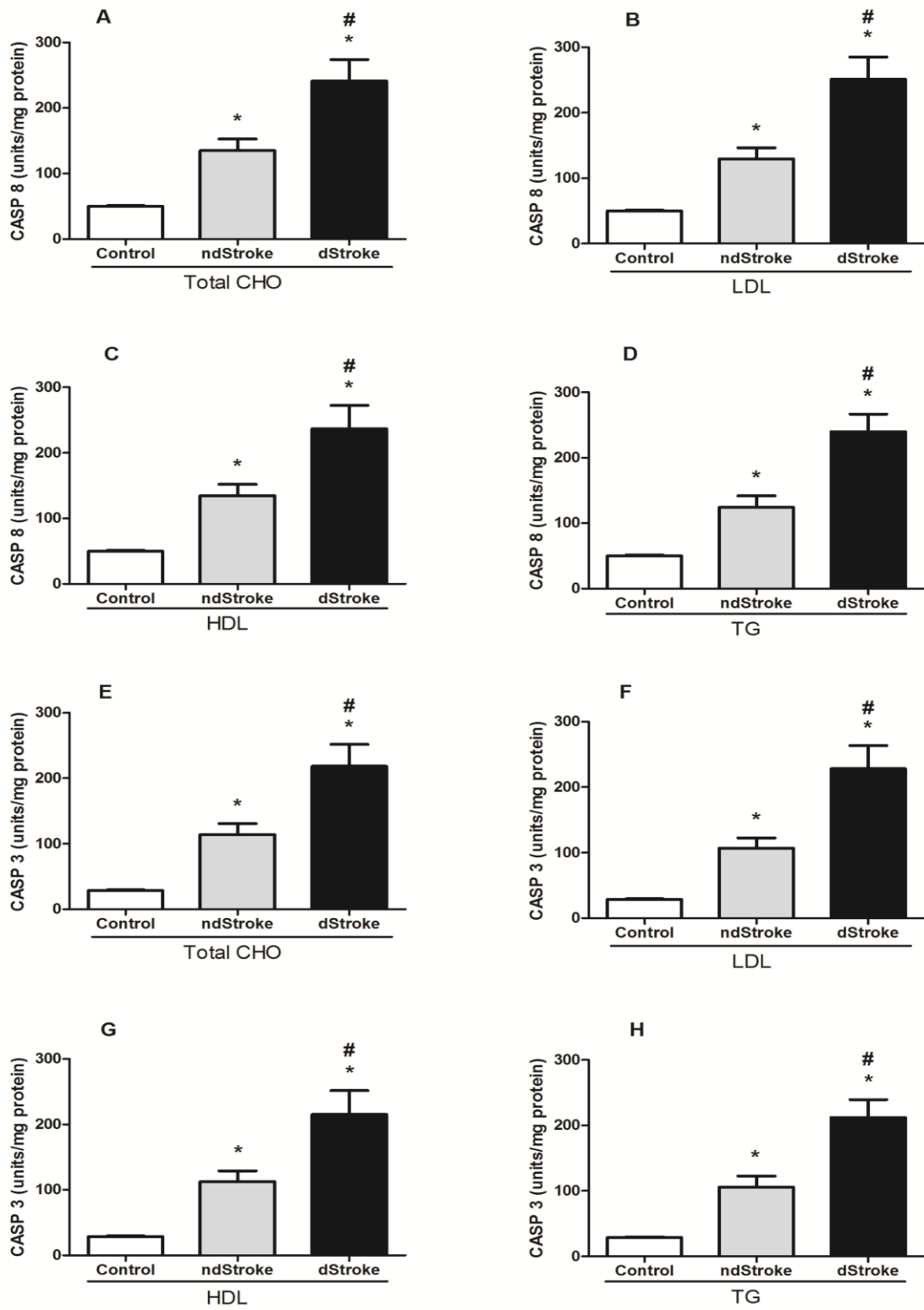




Figure 6



### 3. DISCUSSÃO

Os resultados apresentados neste estudo mostraram um aumento significativo nos níveis de DCF, NO<sub>x</sub>, TNF- $\alpha$ , AChE, CASP 8, CASP 3 e PG nos pacientes pós-AVE quando comparados com o grupo controle. Também foi observado que os níveis aumentados de TNF- $\alpha$  foi correlacionado positivamente com os marcadores de apoptose (CASP 8 e CASP 3), porém não houve correlação com os marcadores oxidativos (DCFH e NO<sub>x</sub>). Interessantemente, a análise estatística mostrou um aumento significativo dos níveis dos marcadores inflamatórios (TNF- $\alpha$  e AChE) e apoptóticos (CASP 8 e CASP 3) nos pacientes pós-AVE com dislipidemia (AVE<sub>d</sub>) quando comparados com os pacientes pós-AVE sem dislipidemia (AVE<sub>nd</sub>) e com o grupo controle, sugerindo uma associação entre esses eventos na fase crônica do AVE.

Dados na literatura mostram que a desregulação da circulação sanguínea cerebral compromete a perfusão no encéfalo pós-AVE, aumentando a probabilidade de comprometimento vascular e danos secundários à doença (CULMSEE e KRIEGLSTEIN, 2007; BENEDICTO et al., 2008; LAMBERTSEN et al., 2012). A fisiopatologia do AVE é complexa e envolve diversos processos, entre eles a toxicidade induzida por RLs e citocinas, assim como a infiltração leucocitária (LOVE, 1999), sugerindo que o estresse oxidativo, a neuroinflamação e a apoptose sejam fatores associados ao dano neurovascular (CHONG et al., 2005; YAMAMOTO et al., 2008). Enquanto a maioria dos estudos procura entender os mecanismos dos danos neuronais agudos após o AVE, ainda existem poucos estudos sobre estes eventos na fase mais tardia da disfunção cerebrovascular.

Nesse contexto, a maioria dos estudos (LOVE, S. 1999; SILVA et al., 2011; CECHETTI et al., 2012; TSAI et al., 2014) mostram níveis de ERs aumentados substancialmente na circulação cerebral nos estágios iniciais da reperfusão pós-isquemia, entretanto, poucos autores como Miller et al. (2006) investigaram o aumento nos marcadores de estresse oxidativo após vários dias do insulto cerebrovascular.

Já neste estudo, foi possível observar estes níveis de ERs aumentados mesmo meses após a doença. De fato, os níveis de RLs, como o O<sub>2</sub><sup>-</sup>, podem aumentar na circulação sanguínea cerebral durante o AVE (MILLER et al., 2005;

2009), e podem resultar em uma redução no limiar para toxicidade por estresse oxidativo nos vasos sanguíneos cerebrais. Além disso, o  $O_2^-$  pode reagir com o NO, levando a uma diminuição na biodisponibilidade de NO e aumento na formação de espécies nitrosativas altamente reativas e danosas, que podem contribuir para o dano neuronal, mesmo em fases crônicas do AVE.

Nesta linha de pensamento, Parizadeh et al. (2011) observaram níveis séricos aumentados no balanço pró e anti-oxidantes em pacientes pós-AVE, indicando um estado elevado de estresse oxidativo quando comparados com o grupo controle, porém nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os pacientes com diferentes sequelas pós-AVE baseadas em um prognóstico de seis meses.

Uma explicação plausível para os níveis elevados de ERs persistentes na fase tardia do AVE, seria a presença de mutações das enzimas antioxidantes, como por exemplo a MnSOD. O polimorfismo funcional Ala16Val afeta a localização da MnSOD, assim como sua habilidade em remover os radicais superóxidos, e isto pode contribuir para o aumento na produção de ERs (DUARTE et al., 2010; BRESCIANI et al., 2013) nos pacientes com AVE. Entretanto, as razões para o persistente aumento do estresse oxidativo/nitrosativo ainda não está clara e mais estudos são necessários para esclarecer a participação da MnSOD no AVE.

Outro ponto importante a salientar, é que não foi encontrada correlação entre o aumento nos níveis dos marcadores oxidativos/nitrosativos do grupo AVE com o controle, sendo assim difícil de postular uma relação causa-efeito entre a geração de ERs e o dano cerebral crônico. Não obstante, outra possibilidade a ser considerada é que outros alvos selecionados, os quais podem não contribuir significativamente com o estresse oxidativo/nitrosativo, podem colaborar com o dano encefálico, como por exemplo, os marcadores inflamatórios (TNF- $\alpha$  e AChE).

De fato, estudos mostram uma correlação entre marcadores inflamatórios com o volume de infarto encefálico, severidade do AVE e sequelas clínicas (VILA et al., 2000; DI NAPOLI, 2002; ELKIND et al., 2004), indicando que a inflamação pode ser um contribuinte crucial para a patogênese de diversas disfunções do SNC (VILA et al., 2000; DI NAPOLI e PAPA, 2002; LAMBERSTEN et al., 2012; SHICHITA et al., 2012).

A acetilcolinesterase (AChE) tem um importante papel na resposta imune por rapidamente hidrolisar a ACh (KAWASHIMA e FUJII, 2000), que é conhecida por ter características anti-inflamatórias e suprimir a produção de citocinas pró-inflamatórias

(BOROVIKOVA et al., 2000; KAWASHIMA e FUJII, 2003). Nossos dados revelaram um aumento na atividade da AChE no pacientes pós-AVE, propondo que esta alteração leve a um decréscimo nos níveis de ACh, contribuindo para o estado inflamatório. Embora o papel do sistema colinérgico no AVE ainda não esteja claro, nossos achados sugerem a hipótese de que a AChE pode antagonizar a sinalização colinérgica vagal à nível de macrófagos (OFEK et al., 2007; SHAKED et al 2009), promovendo um efeito inflamatório sistêmico (aumento do TNF- $\alpha$ ) e um aumento na resposta apoptótica (ativação da CASP 8 e CASP 3).

Realmente, níveis aumentados de TNF- $\alpha$  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). A CASP 8 combinada com sua capacidade de induzir a apoptose por meio da via extrínseca, 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). Estes eventos induzem 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, e esta por sua vez, leva a ativação da CASP 3 e disfunção celular (NAMURA et al., 1998; BUDIARDJO, et al., 1999; GRAHAM, 2001; LIOU et al, 2003; SUGAWARA, 2004). A partir da ativação da CASP 3 também ocorre a ativação da DNase ativada por caspases (CAD) (SUGAWARA et al., 2002) e a clivagem de diversos substratos proteicos como a poly (ADP-ribose)- polimerase (PARP), culminando em dano ao DNA (CHEN et al., 1998).

Reforçando esta hipótese, foi possível observar neste estudo uma correlação positiva entre os níveis de TNF- $\alpha$  com a CASP 8 e 3, sugerindo que estes marcadores podem se manter elevados em uma fase crônica do AVE. De acordo, McCoy e Tansey (2008) mostraram que níveis elevados de TNF solúvel pode ser um marcador de neuroinflamação aguda e crônica em algumas doenças neurodegenerativas.

A partir destes achados e de um elegante estudo de Gong et al. (2012) que mostrou uma expressão elevada na CASP 3 e nos níveis séricos de TNF- $\alpha$  em ratos

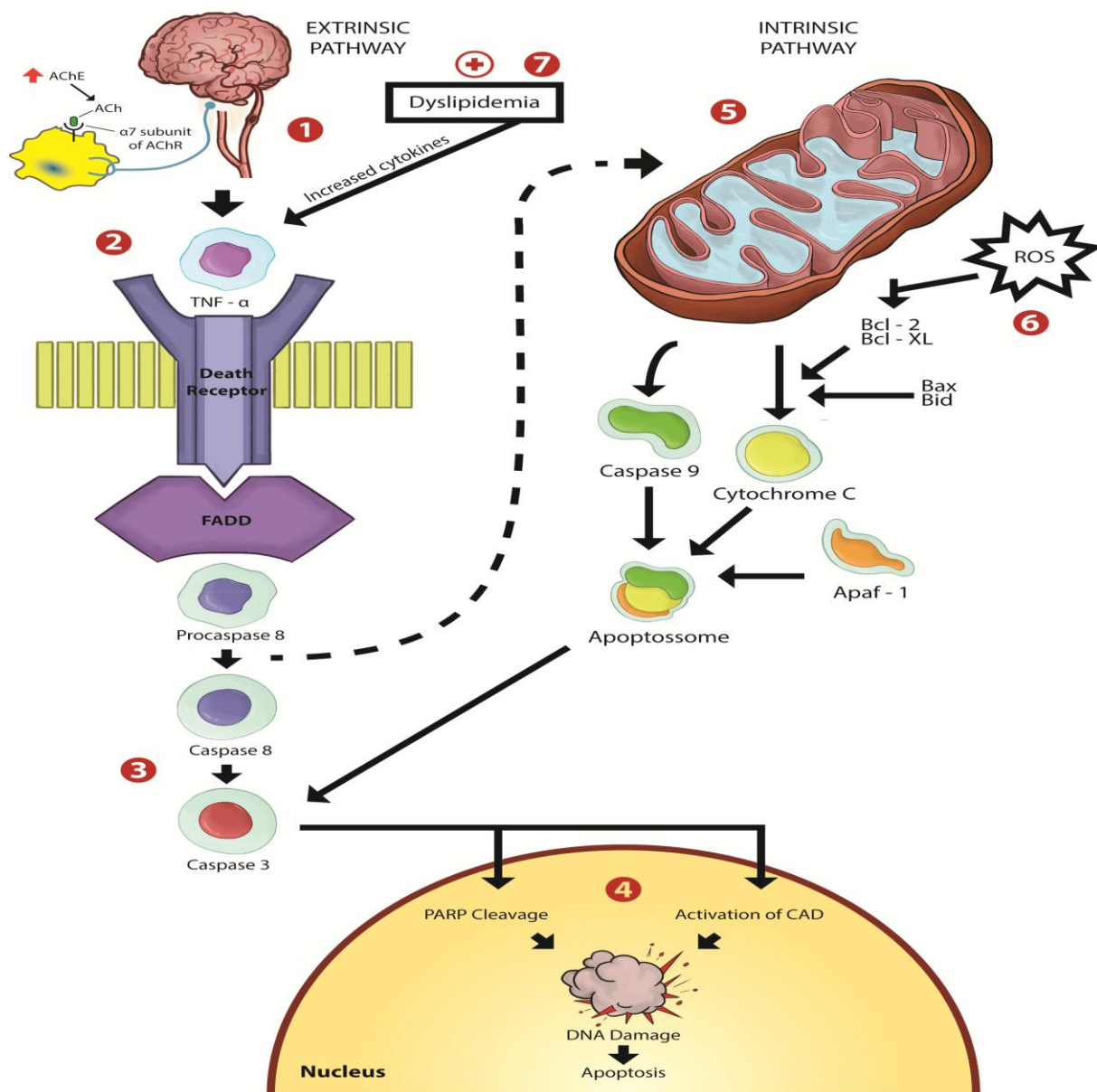
hipercolesterolêmicos após isquemia cerebral, nós resolvemos investigar se existiria uma associação entre os fatores inflamatórios e apoptóticos com marcadores de dislipidemia nos pacientes pós-AVE e grupo controle. Interessantemente, os resultados revelaram que os níveis de TNF- $\alpha$ , AChE, CASP 8 e CASP 3 tiveram uma associação significativa com os níveis de CT, LDL, HDL e TG. Os pacientes pós AVE<sub>d</sub> tiveram os níveis séricos de TNF- $\alpha$ , AChE, CASP 8 e CASP 3 significativamente aumentados em relação aos pacientes pós AVE<sub>nd</sub> e ao grupo controle (Figura 5 e 6 do manuscrito).

A dislipidemia é considerada um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento do AVE, induzindo a aterogênese e aumentando os índices de morbidade/mortalidade (LIBBY, 2002). A placa de ateroma é constituída principalmente de LDL oxidado (LDL<sub>ox</sub>) (SKILTON et al., 2007), formado a partir da ação dos radicais livres (HARRISON et al., 2003, GAUTIER et al., 2009). O LDL<sub>ox</sub> induz á expressão de moléculas que permitem aos monócitos e linfócitos T a possibilidade de aderir-se às células endoteliais (SCALIA et al., 1998). Os monócitos se diferenciam em macrófagos, que captam o LDL<sub>ox</sub> e processam o auto-antígeno ativando os linfócitos T, que por sua vez, promovem a secreção de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- $\alpha$  (QIN et al., 2006; PERSSON et al., 2006; EMMANUEL et al., 2009). Desta forma, é tentador propor que a associação entre marcadores inflamatórios e apoptóticos com a dislipidemia observado em nosso estudo, seja devido aos mecanismos citados anteriormente.

De acordo, Holm et al. (2011) observaram que o aumento na expressão das proteínas ligantes de ácidos graxos nos macrófagos é dependente da pré-ativação do TNF- $\alpha$  e estavam significativamente associados com aumento do LDL oxidado, aumentando a mortalidade por problemas cardiovasculares no pós-AVE agudo.

Finalmente, analisando todos os dados, é plausível sugerir que os marcadores inflamatórios (TNF- $\alpha$  e AChE) e apoptóticos (CASP 8 e CASP 3) estão aumentados em uma fase crônica do AVE, e a dislipidemia colaborar para um acréscimo neste aumento, contribuindo com a possibilidade de novos eventos neurovasculares. Assim, sugere-se que os resultados observados neste estudo podem contribuir, pelo menos parcialmente, para a disfunção neurológica presente no AVE crônico, e que drogas anti-inflamatórias podem representar uma terapia complementar no tratamento destes pacientes.

## 4. CONCLUSÃO



**Figura 6** - Esquema representativo da conclusão da presente Dissertação.

Rota apoptótica extrínseca e intrínseca seguida da isquemia cerebral. Após a isquemia cerebral (1) ocorrem repostas inflamatórias sistêmicas e focais. A sinalização vagal da ACh inibe a produção de citocina inflamatórias, entretanto, a ACh é hidrolisada pela AChE, constituindo assim, uma liberação destas citocinas, entre elas o TNF- $\alpha$  (2), 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) (4). 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 (5-6), permitindo a liberação do citocromo c, que juntamente a caspase 9 e Apaf-1 formarão o apoptossoma, e então ativarão a CASP 3 (3), e a apoptose prossegue assim como na rota extrínseca (4) (rota intrínseca). Além disso, a dislipidemia aumenta a liberação de TNF- $\alpha$ , exacerbando todo este evento (7). Criado por Matheus Tanuri Pascotini (2015).

## REFERÊNCIAS

- AHMAD, M.; GRAHAM, S. H. **Inflammation after stroke: mechanisms and therapeutic approaches.** *Transl. Stroke Res.* 1, 74–84, 2010.
- 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.
- ALBERTINI, R.; MORATTI R.; DE LUCA G. **Oxidation of low-density lipoprotein in atherosclerosis from basic biochemistry to clinical studies.** *Curr Mol Med*, v. 2, p. 579-592, 2002.
- ALVAREZ-SALA, L. A. et al. **Effects of fluvastatin extended-release (80 mg) alone and in combination with ezetimibe (10 mg) on low-density lipoprotein cholesterol and inflammatory parameters in patients with primary hypercholesterolemia: a 12-week, multicenter, randomized, open-label, parallel-group study.** *Clin Ther* 30, 84–97, 2008.
- ANDRADE, W. **Banco de dados do programa SIE, módulo biblioteca, aplicáveis à Ciências Farmacêuticas.** 2011. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2011.
- 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.
- 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.
- BECKER, K. **Endovascular treatment of acute stroke.** *Curr Treat Options Neurol.*; 9:463–469, 2007.
- 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.
- BELDA-LOIS, J. M. et al. **Rehabilitation of gait after stroke: a review towards a top-down approach.** *Journal of NeuroEngineering and Rehabilitation*, 8:66. 2011
- 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.

- BERG, K. K. et al. **The additive contribution from inflammatory genetic markers on the severity of cardiovascular disease.** Scand J Immunol, v. 69, p.36-42, 2009.
- 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.
- BISDAS, S. ET AL. **Comparison of perfusion computed tomography with diffusion-weighted magnetic resonance imaging in hyperacute ischemic stroke.** J. Comput. Assist. Tomogr. 28, 747–755, 2004.
- BORN, G. V. **Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal.** Nature. Jun 9;194:927-9, 1962.
- BOROVIKOVA L. V. et al. **Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin.** Nature.; 405(6785):458-62, 2000.
- BREDER, J. et al. **Inhibition of different pathways influencing Na(+) homeostasis protects organotypic hippocampal slice cultures from hypoxic/hypoglycemic injury.** Neuropharmacology 39, 1779–1787, 2000.
- BRESCIANI, G. et al. **The Ala16Val MnSOD gene polymorphism modulates oxidative response to exercise.** Clin Biochem, 2012.
- BROUGHTON, B. R.; REUTENS, D. C.; SOBEY, C. G. **Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia.** Stroke 40, e331–e339, 2009.
- BRUCK, I. et al. **Cerebellar vermishypoplasia – non progressive congenital ataxia.** Arq. Neuro-Psiquiatr.58(3-B):897-900, 2000.
- CECHETTI, F. et al. **Environmental enrichment prevents behavioral deficits and oxidative stress caused by chronic cerebral hypoperfusion in the rat.** Life Sci. 91:29-36, 2012.
- CHAI, J. et al. **Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO.** Nature 406:855–862, 2000.
- CHARAKIDA, M. et al. **Inflammatory and thrombotic processes are associated with vascular dysfunction in children with familial hypercholesterolemia.** Atherosclerosis, v. 204, p. 532-537, 2009.
- CHAMORRO, A. **Role of inflammation in stroke and atherothrombosis.** Cerebrovascular Diseases, vol.17, no.3, supplement, pp. 1–5, 2004.
- CHAMORRO, A.; HALLENBECK, J. **The harms and benefits of inflammatory and immune responses in vascular disease.** Stroke 37, 291–293, 2006.
- CHAN, P. H. **Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain.** J Cereb Blood Flow Metab 21:2–14, 2001.
- CHAN P.H. **Role of oxidants in ischemic brain damage.** Stroke 27: 1124–1129, 1996.



CHANG, C. Z.; KWAN, A.L.; HOWNG, S. L. **6-Mercaptopurine exerts an immunomodulatory and neuroprotective effect on permanent focal cerebral occlusion in rats.** Acta Neurochir (Wien).152:1383–1390, 2010.

CHEN, H. et al. **Oxidative stress in ischemic brain damage:** mechanisms of cell death and potential molecular targets for neuroprotection. Antioxidants and redox signaling Vol. 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 Neurosci18:4914–4928, 1998.

CHERUBINI, A. et al. **Potential markers of oxidative stress in stroke.** Free Radical Biology and Medicine, vol.39, no.7,p. 841–852, 2005.

CHONG, Z. Z.; LI F. Q.; MAIESE, K. **Oxidative stress in the brain:** Novel cellular targets that govern survival during neurodegenerative disease. Progress in Neurobiology, 75:207-46, 2005.

CORBETT, D.; LARSEN, J.; LANGDON, K. D. **Diazepam delays the death of hippocampal CA1 neurons following global ischemia.** Exp Neurol. 214:309–314, 2008.

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

DE SILVA, T. et al. **Nox2 oxidase activity accounts for the oxidative stress and vasomotor dysfunction in mouse cerebral arteries following ischemic stroke.** PlosOne, 2011.

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

DEVERAUX Q. L.; REED, J. C. **IAP family proteins–suppressors of apoptosis.** Genes Dev 13:239–252, 1999.

DI NAPOLI, M.; PAPA, F. **Inflammation, hemostatic markers and antithrombotic agents in relation to long-term risk of new cardiovascular events in first-ever ischemic stroke patients.** Stroke. 33:1763–71, 2002.

DROGE, W. **Free radicals in the physiological control of cell function.** Physiol Rev82: 47–95, 2002.

DUARTE, M. M. **Banco de dados do programa SIE, módulo biblioteca, aplicáveis à Ciências Biológicas.** 2008. 148 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2008.

DUARTE, M. M. et al. **Oxidative stress in hypercholesterolemia and its association with Ala16Val superoxide dismutase gene polymorphism.** Clin Biochem, 2010.

DUNCAN, P. M. et al. **Protocol for the Locomotor Experience Applied Post-stroke (LEAPS) trial: a randomized controlled Trial.** BMC Neurology, 8:7-39, 2007.

ELKIND, M.S. et al. **Leukocyte count predicts outcome after ischemic stroke: the Northern Manhattan Stroke Study.** *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* 13:220–7, 2004.

EMMANUEL, L. **Regulation of the migration and survival of monocyte subsets by chemokine receptors and its relevance to atherosclerosis.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 29, p. 1412-1418, 2009.

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

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

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

GARRITANO, C. R. et al. **Analysis of the mortality trend due to cerebrovascular accident in brazil in the xxi century.** *Arq Bras Cardiol.* 2012; *in press.*

GAUTIER, E.; JAKUBZICK, C.; RANDOLPH, G. J. **Regulation of the migration and survival of monocyte subsets by chemokine receptors and its relevance to atherosclerosis.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 29, p. 1412-1418, 2009.

GERTZ, K. et al. **Essential role of interleukin-6 in post-stroke Angiogenesis.** *Brain*; 135: 1964–1980, 2012.

GIULIANI, D. et al. **Neuroprotection in focal cerebral ischemia owing to delayed treatment with melanocortins.** *Eur J Pharmacol.* 570:57–65, 2007.

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*, vol. 42, no. 2, pp. 517–584, 2011.

GONG, W. et al. **Coexistence of hyperlipidemia and acute cerebral ischemia/reperfusion induces severe liver damage in a rat model.** *World J Gastroenterol.* September 21; 18(35): 4934-4943, 2012.

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

GUZIK, T. J.; KORBUT, R.; ADAMEK-GUZIK, T. **Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation.** *Journal of Physiology and Pharmacology*, vol.54, no.4,pp.469–487, 2003.

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. **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.

HARRISON, D. et al. **Role of oxidative stress in atherosclerosis.** Am J Cardiol, v. 91, p. 7A–11A, 2003.

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. 90, 388–395, 2012.

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.

HORN, T. S. et al **Effect of intrathecal baclofen bolus injection on lower extremity joint range of motion during gait in patients with acquired brain injury.** Arch Phys Med Rehabil. 91:30-4, 2010.

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.

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. 27, 219–249, 2007.

HOSSMANN, K. **Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia.** Ann. Neurol. 36, 557–565, 1994.

IMAMURA, T. et al. **LDL cholesterol and the development of stroke subtypes and coronary heart disease in a general Japanese population: the Hisayama study.** Stroke; 40: 382–388, 2009.

JONES, J. L.; LAKASING, E.; ARCHONTAKIS, S. **Familial Hypercholesterolaemia: different perspectives.** Nurs Stand, v. 50, p. 35-38, 2009.

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.

KAWASHIMA, K.; FUJII, T. **The lymphocytic cholinergic system and its contribution to the regulation of immune activity.** Life Sci; 74:675–96, 2003.

KELES, T. et al. **The comparison of the effects of standard 20 mg atorvastatin daily and 20 mg atorvastatin every other day on serum LDL-cholesterol and high sensitive C-reactive protein levels.** *Anadolu Kardiyol Derg* 8,407–412, 2008.

KUMAR, G. et al. **Penumbra, the basis of neuroimaging in acute stroke treatment: current evidence.** *J. Neurol. Sci.* 288, 13–24, 2010.

LAFON-CAZAL, M. et al. **NMDA-dependent superoxide production and neurotoxicity.** *Nature*, vol.364, no.6437, pp.535–537, 1993.

LAM, J.M. et al. **Predictors of Response to Treadmill Exercise in Stroke Survivors.** *Neurorehabil Neural Repair.* 24: 567–574, 2010.

LAMBERTSEN, K. L.; BIBER, K.; FINSEN, B. **Inflammatory cytokines in experimental and human stroke.** *J Cereb Blood Flow Metab*, 32:1677–1698, 2012.

LEES, K. R. et al. **Time to treatment with intravenous alteplase and outcome in stroke: an updated pooled analysis of ECASS, ATLANTIS, NINDS, and EPITHET trials.** *The Lancet*, vol. 375, no. 9727, pp. 1695–1703, 2010.

LEVITAN, I.; VOLKOV, S.; SUBBAIAH, P. V. **Oxidized LDL: Diversity, patterns of recognition and pathophysiology.** *Antioxid Redox Signal*, 2009, doi:10.1089/ars.2009.2733 (*in press*).

LI, H. et al. **Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis.** *Cell* 94:491–501, 1998.

LIBBY, P. **Changing concepts of atherogenesis.** *J Int Med Res*, v. 247, p. 349-358, 2000.

LIYOU, 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.

LIEPERT, J. **Evidence-based methods in motor rehabilitation after stroke.** *Fortschr Neurol Psychiatr.* 80:388-93, 2012.

LIPTON, S. A.; ROSENBERG, P. A. **Mechanisms of disease: excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders.** *New England Journal of Medicine*, vol.330, no. 9, pp. 613–622, 1994.

LOVE, S. **Oxidative stress in brain ischemia.** *Brain Pathology*,9:119-31, 1999.

MACKO, R. F. et al. **Treadmill exercise rehabilitation improves ambulatory function and cardiovascular fitness in patients with chronic stroke: a randomized, controlled trial** *Stroke*, 36:2206-2211, 2005.

MARTINEZ-HERVAS, S. et al. **Increased plasma xanthine oxidase activity is related to nuclear factor kappa beta activation and inflammatory markers in familial combined hyperlipidemia.** *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 20,734–739, 2010.

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. 12(2): 130-9, 2004.

MCCOY, M. K.; MALÚ, G. T. **TNF signaling inhibition in the CNS:** implications for normal brain function and neurodegenerative disease. *Journal of Neuroinflammation*, 2008.

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

MILLER, A. A. et al. **NADPH oxidase activity and function are profoundly greater in cerebral versus systemic arteries.** *Circ Res* 97: 1055–1062, 2005.

MILLER, A. A. et al. **NADPH-oxidase activity is elevated in penumbral and non-ischemic cerebral arteries following stroke.** *Brain Res* 1111: 111–116, 2006.

MILLER, A. A. et al. **NADPH oxidase activity is higher in cerebral versus systemic arteries of four animal species:** role of Nox2. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 296: H220–225, 2009.

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.

MEHTA, S.; MANHAS, N.; RAGHUBIR, R. **Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics.** *Brain Res. Rev.* 54, 34–66, 2007.

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

MONGIN, A. **Disruption of ionic and cell volume homeostasis in cerebral ischemia:** the perfect storm. *Pathophysiology* 14, 183–193, 2007.

MORO, M. A. et al. **Mitochondrial respiratory chain and free radical generation in stroke.** *Free Radic Biol Med.* ; 39:1291-304, 2005.

MURABITO J. M.; et al. **Intermittent claudication.** A risk profile from The Framingham Heart Study. *Circulation.* 96(1): 44-49,1997.

MURAO L. A. et al. **Elevated levels of cell-free circulating DNA in patients with acute dengue virus infection.** *PLoS One.*;17:e25969, 2011.

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*, vol. 130, no. 2, pp. 169–175, 2001.

NAMURA, S.; ZHU, J.; FINK, K.; ET AL. **Activation and cleavage of caspase-3 in apoptosis induced by experimental cerebral ischemia.** *J Neurosci*; 18:3659-3668, 1998.

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*; 40:341-347, 2006.

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.

OKAMURA, T. et al. **The relationship between serum total cholesterol and all-cause or cause-specific mortality in a 17.3-year study of a Japanese cohort.** *Atherosclerosis*; 190: 216–223, 2007.

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.

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

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.

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

SOMMERFELD, D. K.; GRIPENSTEDT, U.; WELMER, A. K. **Spasticity After Stroke: An Overview of Prevalence, Test Instruments, and Treatments.** *Am J Phys Med Rehabil.* 91:814-820, 2012.

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

PARIZADEH, M. R. et al. **Prooxidant-antioxidant balance in stroke patients and 6-month prognosis.** *Clin Lab.*;57(3-4):183-91, 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.

PERSSON, J.; NILSSON, J.; LINDHOLM, M. W. **Cytokine response to lipoprotein lipid loading in human monocyte-derived macrophages.** Lipids Health Dis, v. 5, n. 17, p. 1– 8, 2006.

PIANTADOSI, C. A. ZHANG, J. **Mitochondrial generation of reactive oxygen species after brain ischemia in the rat.** Stroke, vol.27, no.2,pp. 327–332,1996.

PILLA, C. et al. **ATP diphosphohydrolase activity (apyrase, EC 3.6.1.5) in human blood platelets.** Platelets.;7(4):225-30, 1996.

RHA, J. H.; SAVER, J. L. **The impact of recanalization on ischemic stroke outcome: a meta-analysis.** Stroke, vol. 38, no. 3, pp. 967–973, 2007.

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.

SAMSON, Y.; LAPERGUE, B.; HOSSEINI, H. **Inflammation and ischaemic stroke: current status and future perspectives.** Revue Neurologique, vol.161,no.12,pp.1177–1182, 2005.

SCALIA, R.; APPEL, J. Z.; LEFER, A. M. **Leukocyte-endothelium interaction during the early stages of hypercholesterolemia in the rabbit: role of P-selectin, ICAM-1, and VCAM-1.** Arterioscler Thromb Vasc Biol, v. 18, p. 1093-1100, 1998.

SCHIESS, M. C. et al. **Prospective 12-month study of intrathecal baclofen therapy for poststroke spastic upper and lower extremity motor control and functional improvement.** Neuromodulation. 2010.

SCHMID, A. et al. **Improvements in Speed-Based Gait Classifications Are Meaningful.** Stroke, 38:2096-2100, 2007.

SCHNEIDER-BRACHERT, W. et al. **Compartmentalization of TNF receptor 1 signaling: internalized TNF receptors as death signaling vesicles.** Immunity. Sep;21(3):415-28, 2004 .

SHAFI, N.; LEVINE, J.M. **Emergency management of acute ischemic stroke.** Curr Atheroscler Rep.; 12:230–235, 2010.

SHICHITA, M. et al. **Post-ischemic inflammation in the brain.** Frontier In. Volume 3; Article 132, 2012.

SIES, H. **Oxidative stress: oxidants and antioxidants.** Experimental Physiology, vol. 82, no. 2, pp. 291–295, 1997.

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.

SKILTON, M.R. et al. **A comparison of the NCEP-ATPIII, IDF and AHA/NHLBI metabolic syndrome definitions with relation to early carotid atherosclerosis in subjects with hypercholesterolemia or at risk of CVD: evidence for sex-specific differences.** Atherosclerosis, v. 190, p. 414-422, 2007.

SMITH, W. S. et al. **Mechanical thrombectomy for acute ischemic stroke: final results of the Multi MERCI trial.** Stroke 39, 1205–1212, 2008.

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

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 Neurosci22:209–217, 2002.

SUGAWARA, T. et al. **Neuronal death/survival signaling pathways in cerebral ischemia.** Neuro Rx;1:17-25, 2004.

TASCHNER, C. A. et al. **Mechanical thrombectomy with the Penumbra recanalization device in acute ischemic stroke.** J. Neuroradiol. 38, 47–52, 2011.

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.

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

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

VAN DE PORT I. G. L. et al **Effects of circuit training as alternative to usual physiotherapy after stroke: randomized controlled trial.** BMJ; 344:e2672, 2012.

VILA, N. et al. **Proinflammatory cytokines and early neurological worsening in ischemic stroke.** Stroke;31:2325-9, 2000.

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.

XAVIER, H. T. et al. **V Diretriz brasileira de dislipidemias e prevenção de aterosclerose.** Arq Bras Cardiol; Vol 101, n.4, Supl. 1; p-10, 2013.



XU, T. et al. **Dyslipidemia and outcome in patients with acute ischemic stroke.** Biomed Environ Sci; 27(2): 106-110, 2014.

WEINSTEIN, P.; HONG, S.; SHARP, F. **Molecular identification of the ischemic penumbra.** Stroke 35 (11), S2666–S2670, 2004.

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

YAMAMOTO, E. et al. **Excess salt causes cerebral neuronal apoptosis and inflammation in stroke-prone hypertensive rats through angiotensin ii-induced nadph oxidase activation.** Stroke, 39:3049-56, 2008.

ZHANG, Q. C. et al. **NMDA receptor/L-VGCC-dependent expression and AMPA/KA receptor-dependent activation of c-Jun induced by cerebral ischemia in rat hippocampus.** Neurosci. Lett. 398, 268–273, 2006.

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

ZHANG, W. H. et al. **Nortriptyline protects mitochondria and reduces cerebral ischemia/hypoxia injury.** Stroke.; 39:455–462, 2008.

ZEMKE, D. et al. **Ischemia and ischemic tolerance in the brain: an overview.** Neurotoxicology. Dec;25(6):895-904, 2004.

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.

**ANEXOS**

## ANEXO I

## Dados não mostrados

Figura 7

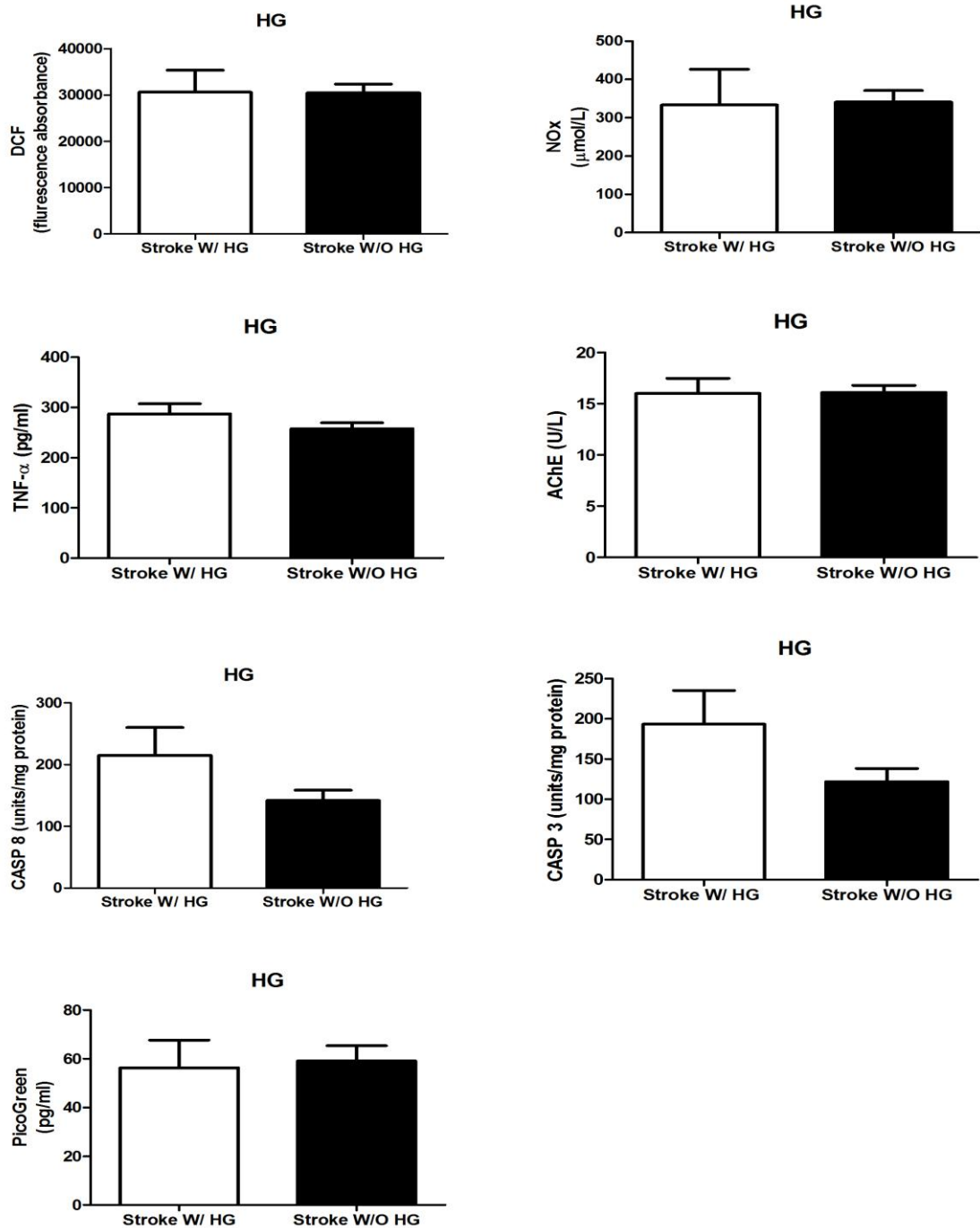


Figura 7 – Valores dos marcadores analisados neste estudo (DCF, NOx, TNF-α, AChE, CASP 8, CASP 3 e PG) em relação à medicação hipoglicemiante (HG).

Figura 8

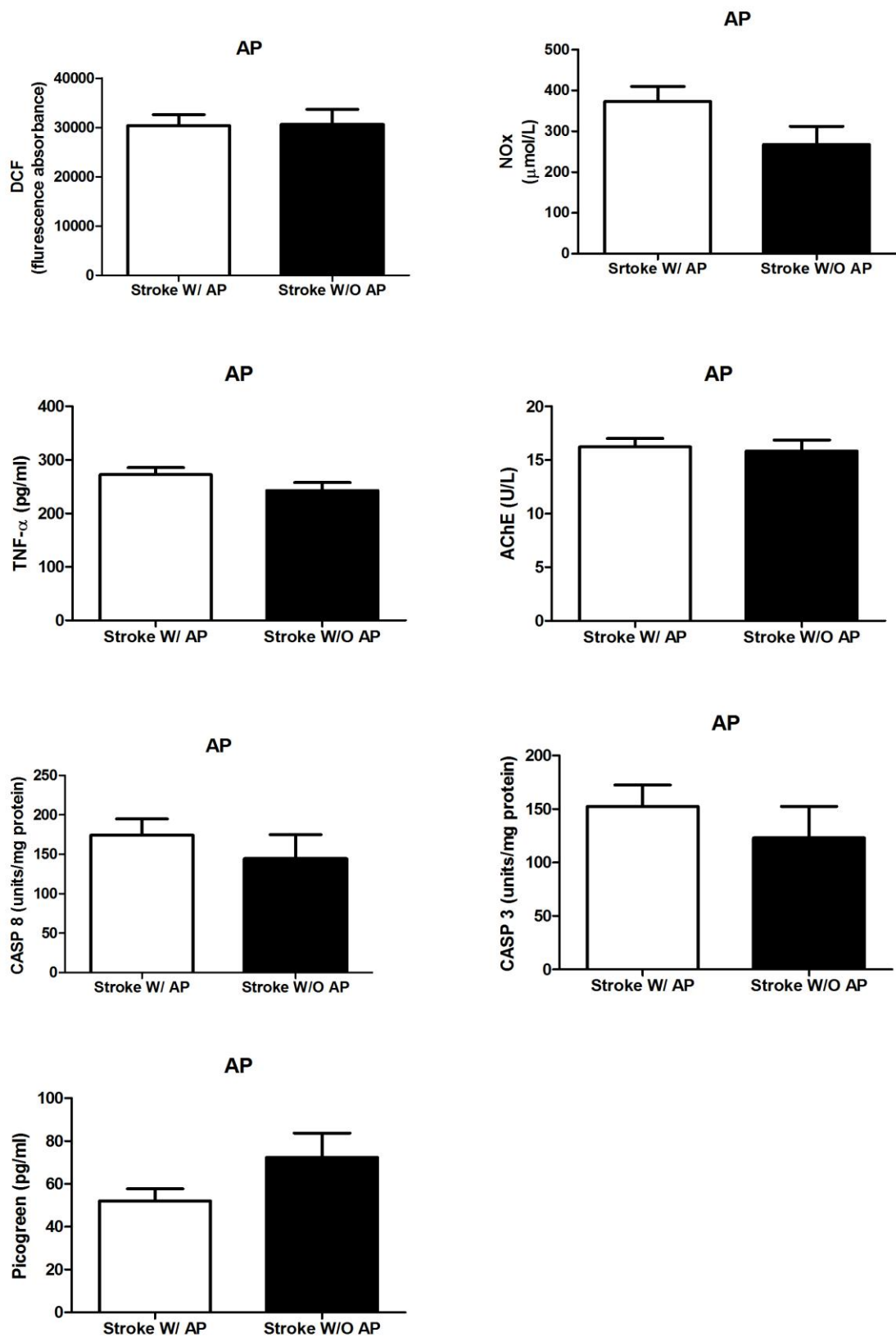


Figura 8 – Valores dos marcadores analisados neste estudo (DCF, NOx, TNF- $\alpha$ , AChE, CASP 8, CASP 3 e PG) em relação à medicação antiplaquetária (AP).

Figura 9

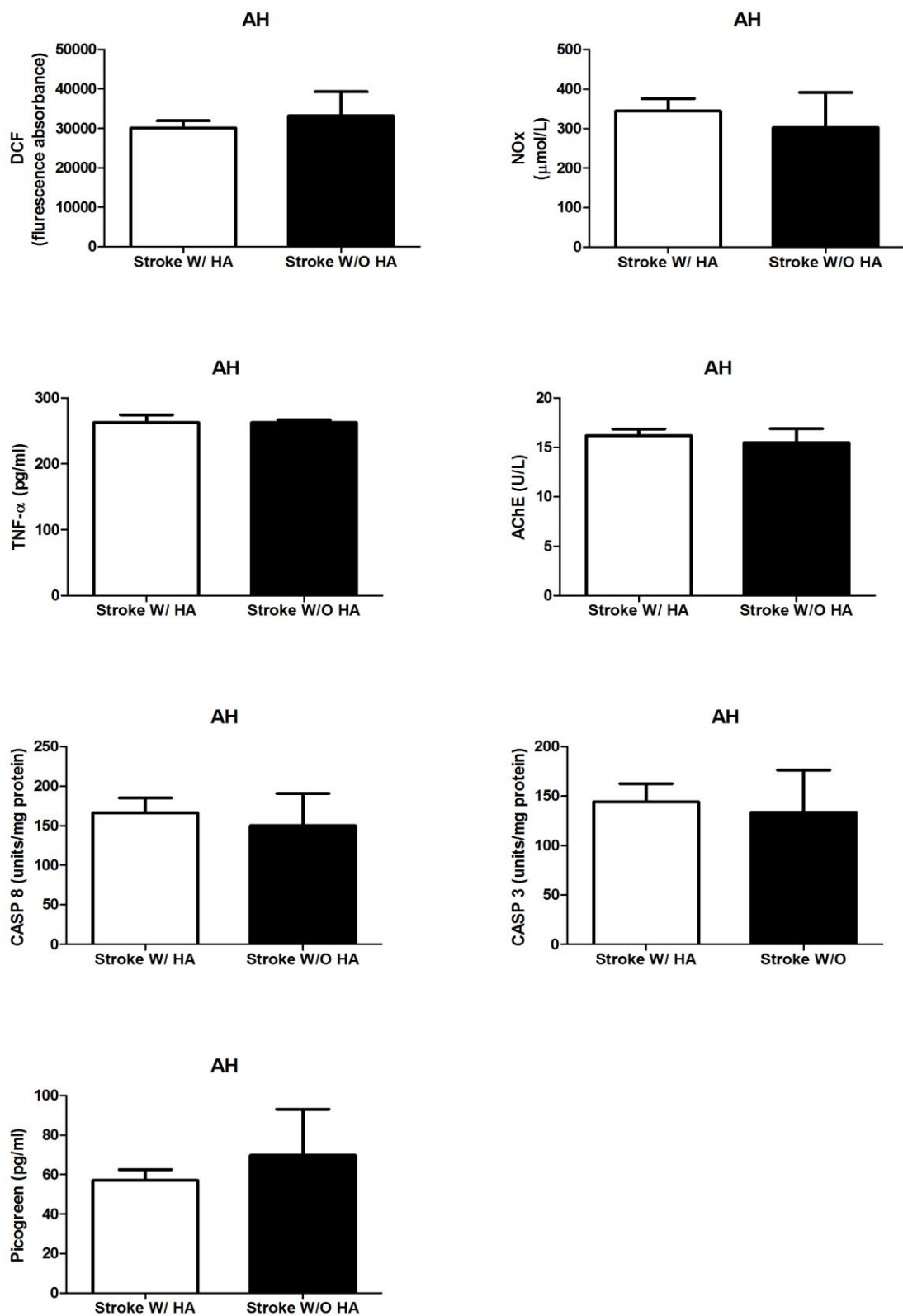


Figura 9 – Valores dos marcadores analisados neste estudo (DCF, NOx, TNF- $\alpha$ , AChE, CASP 8, CASP 3 e PG) em relação à medicação anti-hipertensiva (AH).

Figura 10

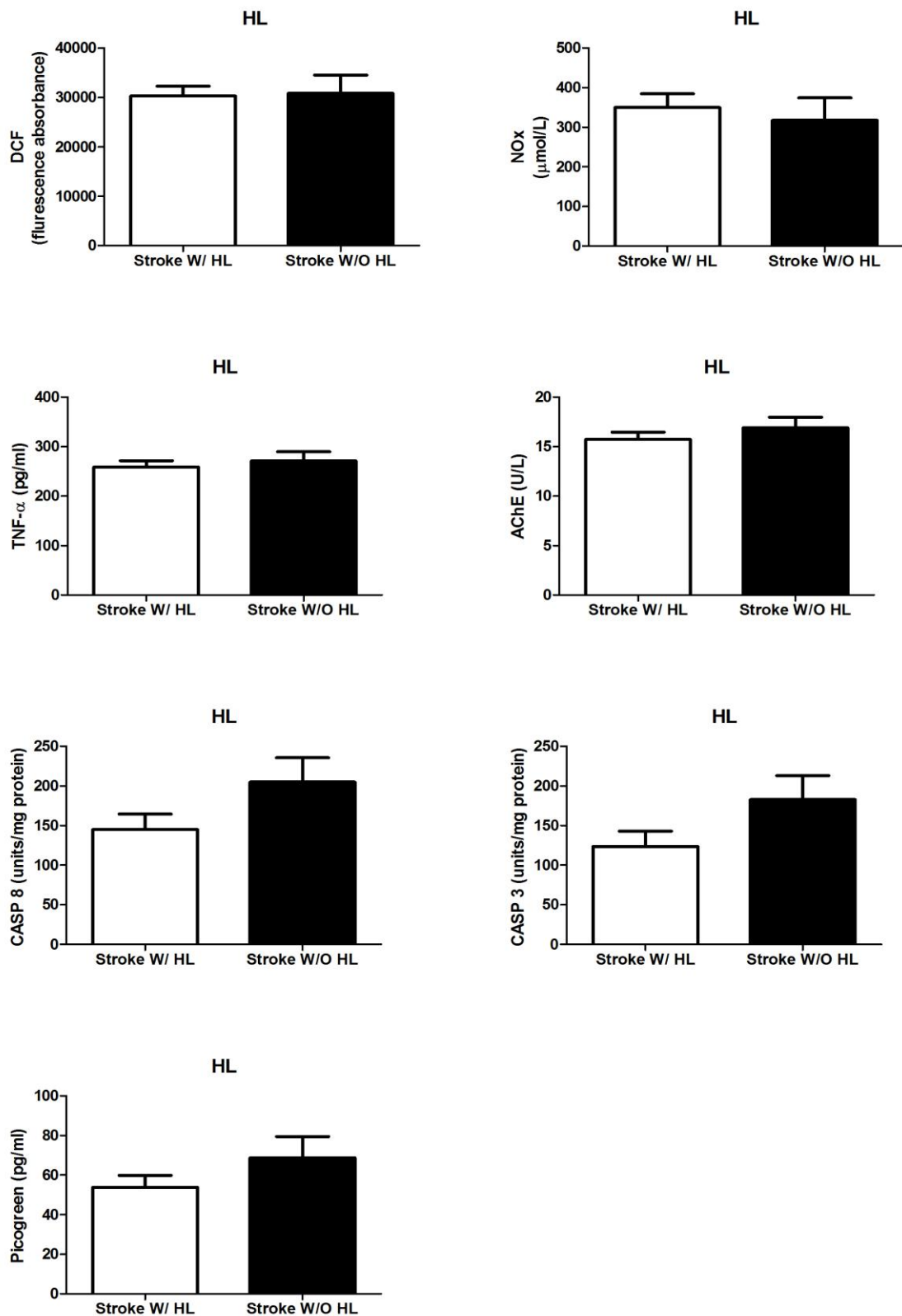


Figura 10 – Valores dos marcadores analisados neste estudo (DCF, NOx, TNF- $\alpha$ , AChE, CASP 8, CASP 3 e PG) em relação à medicação hipolipimante (HL).

## ANEXO II

## 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 III

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**Título do estudo: “ASSOCIAÇÃO DA VIA INFLAMATÓRIA E APOPTÓTICA NA PATOFISIOLOGIA DO ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO TARDIO: RELAÇÃO COM A DISLIPIDEMIA”**

**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 estudo: “ASSOCIAÇÃO DA VIA INFLAMATÓRIA E APOPTÓTICA NA PATOFISIOLOGIA DO ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO TARDIO: RELAÇÃO COM A DISLIPIDEMIA”**



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 IV****TERMO DE CONFIDENCIALIDADE**

**Título do projeto: “ASSOCIAÇÃO DA VIA INFLAMATÓRIA E APOPTÓTICA NA PATOFISIOLOGIA DO ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO TARDIO: RELAÇÃO COM A DISLIPIDEMIA”.**

**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 CAEE .....

Santa Maria,.....de .....de 20.....

.....

Assinatura do pesquisador responsável